

면역질환 치료용 약제학적 조성물

{PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS}

기술분야

5

본 발명은 MHC(Major Histocompatibility Complex) Class II 분자와
이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의
결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수
있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로
10 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T
림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

종래기술

15 면역 반응이란 각종 이물질, 세균 또는 바이러스 등의 자신이 아닌
것으로부터 자신을 보호하는 과정으로, 자신은 공격하지 않도록 정교하게
설계되어 있다. 그러나 이러한 면역 반응이 오히려 자신을 공격하여 자신에게
해를 미치는 경우가 있는데, 대표적인 예가 장기 또는 조직 이식 후와
자가면역이다.

20 장기 또는 조직 이식에 의한 질병 치료에 있어서, 가장 큰 문제점은
수령자가 공여자로부터 조직 또는 장기를 이식받은 후에 심각한 장기이식
합병증을 보인다는 것이다. 장기이식 합병증은 이식편의 공여자와 수령자간의
유전적 배경이 상이함에 따라 서로를 이물질로 인식하여 배제하려는 면역
반응을 의미한다. 이러한 장기이식 합병증은 T 림프구에 의한 세포성 면역과
25 항체에 의한 체액성 면역이 복잡하게 제후된 형태로 일어나지만, 주로 T
림프구에 의한 세포성 면역이다.

장기이식 합병증을 치료하기 위한 하나의 방법으로 T 림프구의 활성을 억제하는 화합물들이 이용되고 있다. 예를 들면, 미조리빈(mizoribine; MZ), 사이클로스포린(cyclosporin; CsA), 타크롤리무스(tacrolimus; FK-506), 아자티오프린(azathioprine; AZ), 레플루노마이드(leflunomide; LEF),
5 프레도니솔론(predonisolon) 또는 메틸프레도니솔론(methylpredonisolon) 등의 부신피질 스테로이드, 데옥시퍼구알린(deoxypergualin; DGS) 및 시롤리무스(sirolimus) 등이 있다.

국제특허공개 WO 1999/65908호는 피롤로[2,3-디] 피리미딘 화합물을 면역 억제제로 이용하여 자가면역 질환을 치료하는 방법을 개시하고 있으며,
10 국제특허공개 WO 2000/21979호는 사이클릭 테트라펩티드 화합물을 이용하여 장기 이식 거부 반응 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법을 개시하고 있다.
한편, 면역 세포가 자신과 외부 물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하는 경우가 있는데 이러한 현상을 “자가면역(autoimmune)” 이라고 한다. 이러한 자가 면역은 인체의 모든 부위에 걸쳐서 질병을 유발시킬 수 있는데, 예를
15 들면, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 경화증((Multiple Sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 그레이브스병(Grave' s Disease), 하시모토씨 갑상선염(Hashimoto' s Thyroiditis), 애디슨병(Addison' s Disease), 백반증(Vitilligo), 경피증 (Scleroderma), 굿패스처 신드롬(Goodpasture syndrome), 베제트병(Becet' s Disease),
20 크론병(Crohn' s Disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis), 포도막염(Uveitis), 혈소판 감소성 자반증(Thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 소아 당뇨병(Diabetes), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune Anemia), 크라일로글로불린증(Cryoglobulinemia), 부신백질이영양증(ALD), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus,
25 SLE) 등이 있다.

국제특허공개 WO 1996/40246호는 다발성 경화증과 같은 T 림프구

매개된 자기면역 질환을 치료 및 예방하는 방법에 관한 것으로 보다 자세하게는 피검자에게 접촉 의존성 헬퍼 이펙터 기능을 매개하는 T 림프구의 표면상의 수용체의 길항제를 치료 또는 예방 유효량으로 투여하는 방법에 관한 것이다. 상기 길항제로는 T 림프구 수용체 gp39에 특이적으로 결합하는 항체
5 또는 이의 단편이 이용된다.

국제특허공개 WO 2002/22212호는 하나 이상의 면역조절항체 및 하나 이상의 B 림프구 고갈 항체, 예를 들어 CD20, CD19, CD22, CD23 또는 CD27을 표적화하는 항체의 조합을 이용하여 자가면역 질환, 바람직하게는 B 림프구 매개 자가면역 질환을 치료하는 방법을 개시하고 있다.

10 그러나, 상술한 화합물을 이용하여 면역질환을 치료하는 경우에는 그 부작용이 심각하여 사용이 제한적이며, 국제특허공개 WO 1996/40246 호와 같이 항체를 단독으로 투여하는 경우에는 충분한 치료 효과를 달성하기 어렵다. 또한, 자가면역 질환 또는 장기 이식 합병증은 T 림프구의 활성화에 의해 시작되므로 국제특허공개 WO 2002/22212호와 같이 B 림프구의 기능을 차단하는
15 것은 효율적인 면역 반응의 억제로 이어지지 못한다.

발명의 요약

보다 효과적인 면역 억제제를 개발하기 위하여 본 발명자들은 T
20 림프구의 활성화에 관여하는 여러 군의 단백질 중 적어도 둘 이상의 군에서 선택된 단백질을 동시에 차단하였을 때 T 림프구의 활성을 공지된 방법들과 비교했을 때 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

본 발명은 한 관점으로 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을
25 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및

사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

5 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 CD2-CD2/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pCD22Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 CTLA4-CTLA4/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pCT44Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pLAG33Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 TNFR2-TNFR1/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pTR21Ig-Top'의 유전자를 지도를 나타낸 것이다.

도 5a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂) 및 연쇄 융합된 이량체 단백질([CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질(1:[TNFR1/Fc]₂, 2:[TNFR2/Fc]₂) 및 연쇄 융합된 이량체 단백질(3:[TNFR2-TNFR1/Fc]₂, 4:[TNFR2-TNFR2/Fc]₂)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([TNFR2/Fc]₂, [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂)이 T-림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

도 6b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + TNFR2/Fc]₂, ([CTLA4/Fc]₂ + [CD2/Fc]₂,

$([CTLA4/Fc]_2 + [LAG3/Fc]_2)$ 이 T-림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

도 6c은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질($[TNFR2-TNFR2/Fc]_2$, $[CD2-CD2/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2$, $[LAG3-LAG3/Fc]_2$)이 T 림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

5 도 6d는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질의 혼합물($[CTLA4-CTLA4/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2 + [TNFR2-TNFR2/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2 + [CD2-CD2/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2 + [LAG3-LAG3/Fc]_2$)이 T 림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

 도 7a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질($[TNFR2/Fc]_2$,
10 $[CD2/Fc]_2$, $[CTLA4/Fc]_2$, $[LAG3/Fc]_2$)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

 도 7b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물($[CTLA4/Fc]_2$, $[CTLA4/Fc]_2 + TNFR2/Fc]_2$, $([CTLA4/Fc]_2 + [CD2/Fc]_2$, $([CTLA4/Fc]_2 + [LAG3/Fc]_2)$)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

15 도 7c는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질($[TNFR2-TNFR2/Fc]_2$, $[CD2-CD2/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2$, $[LAG3-LAG3/Fc]_2$)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

 도 7d는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질의 혼합물($[CTLA4-CTLA4/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2 + [TNFR2-TNFR2/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2 +$
20 $[CD2-CD2/Fc]_2$, $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2 + [LAG3-LAG3/Fc]_2$)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

 도 8a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질($[CD2/Fc]_2$, $[CTLA4/Fc]_2$, $[LAG3/Fc]_2$)이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

25 도 8b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물($[CTLA4/Fc]_2 + [LAG3/Fc]_2$, $[CD2/Fc]_2 + [CTLA4/Fc]_2$)이 이식편대

숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8c는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [CTLA4/Fc]₂ 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

5 도 8d는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂ 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

 도 8e는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂ 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질([TNFR2-TNFR1/Fc]₂ 또는 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂)이
10 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

 도 8f은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질([CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂) 또는 이들의 혼합물([CD2CD2/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂)이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

15

발명의 상세한 설명

 본 발명은 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착
20 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

25 당업계에 알려진 바와 같이 T 림프구는 항원 제시 세포(Antigenic Presenting Cell) 표면상의 “MHC(Major Histocompatibility Complex) Class

II 분자”와 결합된 형태의 항원만을 인식하게 되며, 이어서 활성화되어 상기 항원에 대항할 수 있는 면역 반응을 일으킨다. 이 때, 상기 MHC Class II 분자 이외에 T 림프구에 활성화 신호를 보내는 분자를 “공조자극 분자(Costimulatory Molecules)”라고 하며, 신호를 보내는 기능과 함께 항원
5 제시 세포와 T 림프구의 접촉을 견고하게 하는 분자를 “부착 분자(Adhesive Molecules)”라고 한다. 한편, 다양한 “사이토카인 (Cytokine)”이 T 림프구의 활성화를 포함한 면역 반응에 관여하고 있다.

상기 “MHC Class II 분자”는 T 림프구의 활성화를 개시하는 분자로서, 이의 수용체에는 CD4와 LAG3가 있다. MHC Class II 분자는 항원과 결합된
10 다음 T 림프구의 표면에 위치한 MHC Class II 분자의 수용체(CD4)에 의해 인식되어 T 림프구를 활성화시킨다. 따라서, 이러한 MHC Class II 분자의 기능은 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있다. 그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 MHC Class II 분자의 항체 및 유리 형태의 MHC Class II 분자의 수용체가 포함된다.
15 여기서, 상기 유리 형태의 MHC Class II 수용체는 MHC Class II 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 수용체를 포함하며, MHC Class II 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 전체 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된(glycosylated) Ig 융합 단백질일 수도 있다.

상기 “공조자극 분자”에는 B7(B7.1 및 B7.2), CD154, CD70, OX40L, ICOS-L, 4-1BBL, HVEM, FASL, PDL(PDL-1 및 PDL-2)이 있으며, 이들의 수용체는 각각 CD28과 CTLA-4, CD40, CD27, OX40, ICOS, 4-1BB(CD137), LIGHT, FAS(CD95), PD-1이다. 공조자극 분자는 항원 제시 세포의 표면에 발현되어
20 있으며, T 림프구의 표면에 발현되어 있는 상기 공조자극 분자의 수용체와 결합하여 T 림프구를 활성화시킨다. 따라서, 공조자극 분자에 의한 T 림프구 활성화는 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있다.
25

그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 공조자극 분자의 항체 또는 유리 형태의 공조자극 분자의 수용체가 포함된다. 이 때, 상기 유리 형태의 공조자극 분자의 수용체는 공조자극 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 수용체를 포함하며, 공조자극 분자의 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된 Ig 융합 단백질일 수도 있다.

상기 “부착 분자”에는 LFA-3, ICAM-1, VCAM-1이 있으며, 이들의 수용체는 각각 CD2, LFA-1, VLA-4이다. 부착 분자는 항원 제시 세포의 표면에 발현되어 있으며, T 림프구의 표면에 발현되어 있는 상기 부착 분자의 수용체와 결합하여 T 림프구를 활성화시킨다. 따라서, 부착 분자에 의한 T 림프구의 활성화는 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있으며, 그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 부착 분자의 항체 또는 유리 형태의 부착 분자의 수용체가 포함된다. 이 때, 상기 유리 형태의 부착 분자의 수용체는 부착 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 수용체를 포함하며, 부착 분자의 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된 Ig 융합 단백질일 수도 있다.

상기 “사이토카인”에는 이들로 한정되는 것은 아니지만 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO, M-CSF 등이 있으며, 이들의 수용체는 각각 IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, TNFR, TGFR, IFNR(예, IFN- γ R α -쇄, IFN- γ R β -쇄), 인터페론- α R, - β R 및 - γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130이다. 사이토카인은 B 림프구 또는 T 림프구에 위치한 사이토카인의 수용체와 결합하여 면역 반응을 일으킨다. 따라서 사이토카인에 의한 면역 반응은

사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있다. 그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 사이토카인에 대한 항체 또는 유리 형태의 사이토카인의 수용체가 포함된다. 이 때, 상기 유리 형태의 사이토카인의 수용체는 사이토카인과 특이적으로 결합할 수 있는 모든 5 수용체를 포함하며, 사이토카인의 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된 Ig 융합 단백질일 수도 있다.

10 I. 항체

본 발명에서 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 MHC Class II 분자의 항체가, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 공조자극 분자의 항체가, 부착 분자와 이의 15 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 부착 분자의 항체가, 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 사이토카인의 항체가 각각 포함될 수 있다.

상기 항체는 폴리클로날(polyclonal) 또는 모노클로날(monoclonal) 일 20 수 있으며, 이들은 모두 상업적으로 입수하거나 당업계에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 폴리클로날 항체는 일반적으로 포유동물을 적절한 양의 항원으로 1 회 이상의 회수로 면역화시키고 역가가 일정 수치에 이르렀을 때, 상기 포유동물의 항혈청으로부터 회수하여, 원하는 경우 공지된 공정을 이용하여 정제하고, 사용시까지 냉동 완충된 용액에 저장할 수 있다. 한편, 25 모노클로날 항체는 포유동물에 항원을 주입하여 생긴 B 림프구를 분리해서 마이엘로마 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 만들고 이를 배양하여

항체를 제조할 수 있다. 이러한 공정의 상세한 사항들은 당업계에 잘 알려져 있다.

II. Ig 융합 단백질

5

본 발명에서 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 MHC Class II 분자의 수용체의 Ig 융합 단백질이, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 공조자극 분자의 수용체의 Ig 융합 단백질이, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 부착 분자의 수용체의 Ig 융합 단백질이, 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 사이토카인 수용체의 Ig 융합 단백질이 포함될 수 있다. 이하에서, MHC 수용체, 공조자극 분자의 수용체, 부착 분자의 수용체 및 사이토카인의 수용체는 모두 “수용체”라 통칭한다.

본 발명에서 “Ig 융합 단백질”은 수용체 단백질 또는 이의 세포외역
15 가용성 부위와 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편이 연결된 형태를 포함하는 융합 단백질을 의미한다. 구체적으로 상기 Ig 융합 단백질에는 단순 융합된 단량체, 단순 융합된 이량체, 연쇄 융합된 단량체, 연쇄 융합된 이량체 및 이들의 당쇄화된 단백질이 포함된다.

본 발명에서 “세포외역 가용성 부위(soluble extracellular
20 domain)”는 인지질로 구성된 세포막을 관통하는 단백질(integral protein)에서 소수성 아미노산으로 구성되어 있어 세포막을 통과하는 부분(transmembrane domain)을 기준으로 세포외부로 노출되어 있는 부분을 가리킨다. 이 부위는 대부분 친수성 아미노산이 단백질 표면으로 향하는 구조(folding)를 하고 있어서 수용액상에서 가용성(soluble)을
25 나타낸다. 대부분의 세포표면 수용체 단백질에서 리간드와 결합하는 기능을

담당하는 것은 세포외역 부위이며 세포내역 부위(intracellular domain)는 세포내 신호전달 기능을 담당하고 있다.

본 발명에서 “면역글로불린”은 다양한 종류의 항원을 특이적으로 인식하도록 B 림프구에 의해 생성되고 B 림프구의 항원 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 가리킨다. 이 분자는 Y 모양으로 두 개의 동일한 경쇄와 두 개의 동일한 중쇄로 구성된다. 경쇄와 중쇄 모두는 가변 및 고정 영역을 포함한다. 4 개의 쇠는 힌지 영역이라고 하는 중쇄의 플렉서블 영역(flexible region)에 위치한 디설파이드 결합에 의해 함께 고정되어 있다. 중쇄와 경쇄 모두의 가변 영역은 결합하여 두 개의 동일한 항원-결합 부위를 형성한다. 중쇄 고정 영역에 의해 면역글로불린 A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) 및 M(IgM)인 다섯개 부류로 나누어진다. 보체 활성화, 식세포-Fc 수용체에의 결합, 항원-의존 세포독성과 같은 면역글로불린 분자의 기능은 중쇄의 Fc 영역에 존재하는 구조적 결정소에 의해 매개된다. 이러한 중쇄의 Fc 영역은 본 발명에 따른 Ig 융합 단백질의 구성 요소로서 사용되며 상기 모든 부류의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다.

본 발명에서 “면역글로불린 Fc 단편”은 면역글로불린 분자를 기능적으로 구분되는 단편들로 나누어지는데 이 가운데 항원 결합력은 없으나 쉽게 결정체를 형성하는 단편으로서 힌지 부위(hinge region), CH2 와 CH3 도메인이 결합하여 이루어지고 항체에서 효과물질 및 세포들과의 결합에 관여하는 부분을 가리킨다.

본 발명에서 “연쇄 융합된”이란 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 C-말단에 또 다른 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 N-말단이 펩타이드 결합되어 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위 두 개가 하나의 긴 폴리펩타이드를 형성하고 있는 형태를 의미한다.

본 발명에서 “단순 융합된 단량체 단백질”은 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 하나의

폴리펩타이드로 형성된 단량체 구조의 Ig 융합 단백질을 가리킨다. 단순 융합된 단량체 단백질은 편의상 “수용체 단백질 명칭/Fc” 로 표기할 수 있다. 예를 들면 LAG3 의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질은 LAG3/Fc 로 표기된다. 또한,
5 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는 LAG3/IgG1Fc 로 표기된다.

본 발명에서 “단순 융합된 이량체 단백질” 은 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 Ig 융합 단백질을 가리킨다. 단순 융합된 이량체 단백질은 편의상 “[수용체
10 단백질 명칭/Fc]₂” 로 표기할 수 있다. 예를 들면 LAG3 의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 융합 단백질은 [LAG3/Fc]₂ 로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는
15 [LAG3/IgG1Fc]₂ 로 표기된다.

본 발명에서 “연쇄 융합된 단량체 단백질” 은 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 직렬의 연쇄체 형태로 결합하여 하나의 폴리펩타이드로 형성된 단량체 구조의 Ig 융합
20 단백질을 가리킨다. 연쇄 융합된 단량체 단백질은 편의상 “수용체 단백질 명칭-수용체 단백질 명칭/Fc” 로 표기할 수 있다. 예를 들면, LAG3 의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질의 LAG3 의 세포외역 가용성 부위에 또 다른 LAG3 의 세포외역 가용성 부위가 결합된 연쇄 융합된 단량체 단백질은 LAG3-LAG3/Fc 로
25 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수

있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는 LAG3-LAG3/IgG1Fc 로 표기된다.

본 발명에서 “연쇄 융합된 이량체 단백질”은 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 Ig 융합 단백질을 가리킨다. 연쇄 융합된 이량체 단백질은 편의상 “[수용체 단백질 명칭-수용체 단백질 명칭/Fc]₂”로 표기할 수 있다. 예를 들면, LAG3 의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질의 LAG3 의 세포외역 가용성 부위에 또 다른 LAG3 의 세포외역 가용성 부위가 결합된 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 융합 단백질은 [LAG3-LAG3/Fc]₂ 로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는 [LAG3-LAG3/IgG1Fc]₂ 로 표기된다.

한편, 단순 융합된 단량체 단백질 또는 단순 융합된 이량체 단백질은 모두 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있으며, 연쇄 융합된 단량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허공개 WO 2003/010202 호에 기술된 제조방법을 이용하여 수득할 수 있다.

본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질은 (a) 면역글로불린 Fc 단편을 코딩하는 유전자와 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자로부터 단순 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하고, (b) 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물과 또 다른 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자에 동일한 제한효소 인식서열을 중합효소 연쇄반응으로 삽입하며, (c) 상기 제한효소 인식서열과 일치하는 제한효소를 사용하여, 상기 단순 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA

작제물과 상기 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자의 제한효소 인식서열 부위를 절단하고, (d) 양쪽 DNA 서열의 절단된 부분을 라이게이즈로 연결하여 연쇄 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하며, (e) 제조된 연쇄 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물을 벡터에
5 작동적으로 연결하여 재조합 발현 플라스미드를 작제하고, (f) 작제된 재조합 발현 플라스미드로 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키며, (g) 형성된 형질전환체 또는 형질감염체를 연쇄 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물이 발현되도록 하기에 적절한 조건하에서 배양하여 배양물로부터 목적하는 연쇄 융합된 이량체 단백질을 분리 정제함으로써 제조할 수 있다.

10 본 발명에 따른 당쇄화된 Ig 융합 단백질은 추가적인 당쇄 결합 부위를 갖도록 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 서열상에 O-형 또는 N-형 당쇄수식이 발생하도록 하나 이상의 뉴클레오타이드를 변이시킨 후 그 DNA 를 진행 숙주 세포를 통해 발현하면서 자연적으로 당쇄수식이 일어나도록 함으로써 제조할 수 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명에 따른
15 당쇄화된 Ig 융합 단백질은 N-형 당쇄수식이 일어날 수 있는 Asn-X-Ser/Thr 서열이 부가 및/또는 증가하도록 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 서열을 변이시킴으로써 달성된다.

 본 발명에서는 MHC Class II 분자를 포함하여 공조자극 분자로는 B7
20 분자를, 부착 분자로는 LFA-3 분자를, 사이토카인으로는 TNF를 예로서 설명하고자 한다.

 “MHC Class II 분자”의 경우 이 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체에는 CD4 및 LAG3가 있다. 따라서, MHC Class II 분자와 CD4의 결합을 차단하기 위하여 LAG3의 Ig 융합 단백질을 이용할 수 있다. 구체적으로 MHC
25 Class II 분자와 CD4의 결합을 차단할 수 있는 물질에는 (1) MHC Class II 분자의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 LAG3의 세포외역

가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질; (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질이 포함된다.

“B7 분자”의 경우 이 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체는 CD28과 CTLA4이다. 특히, B7 분자는 T 림프구의 표면에 발현되어 있는 CD28과 결합하여 T 림프구를 활성화시키는데 반하여 또 다른 수용체인 CTLA4(T 림프구가 활성화된 이후에 발현된다)와 결합하게 되면 T 림프구의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서, B7 분자와 CD28의 결합을 차단하기 위하여 CTLA4의 Ig 융합 단백질을 이용하는 것이 바람직하다. 구체적으로 B7 분자와 CD28의 결합을 차단할 수 있는 물질에는 (1) B7 분자의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CTLA4의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 CTLA4의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 CTLA4의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질; (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (6)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질이 모두 포함된다.

“LFA3 분자”의 T 림프구 활성화 기능은 LFA-3과 T 림프구 표면상의 CD2와의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있는데 그러한 물질로는 (1) LFA-3의

- 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CD2의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된
- 5 CD2의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 CD2의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질; (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질이 모두 포함된다.
- 10 “TNF”의 면역 반응 활성화 기능은 TNF와 T 림프구 표면상의 TNFR의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있는데 그러한 물질로는 (1) TNF의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 TNFR의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된
- 15 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 TNFR의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 TNFR의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질; (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된
- 20 단백질이 모두 포함된다.

III. 면역질환

- 본 발명에 따른 활성 성분은 T 림프구의 활성화를 억제할 수 있기
- 25 때문에 원치 않는 T 림프구의 활성화로 인하여 유발되는 각종 질병을 치료하는데 이용할 수 있다. 그러한 질병의 대표적인 예로는 장기 이식

합병증과 자가면역 질환이 있다.

“장기이식 합병증(Transplantation Rejection)”이란, 이식편(이식되는 생체의 일부로 세포, 조직 또는 장기)의 공여자와 수령자간의 유전적 배경이 상이하여 (1) 공여자의 이식편 유래 면역 세포가 수령자를 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편대 숙주질환) 및 (2) 수령자가 공여자의 이식편을 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편 거부반응)을 의미한다.

한편, 면역 세포가 자신과 이물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하여 발생하는 질병을 자가면역 질환이라고 통칭하는데 구체적으로, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 그레이스 병(Grave's Disease), 하시모토씨 갑상선염(Hashimoto's Thyroiditis), 애디슨병(Addison's Disease), 백반증(Vitilligo), 경피증(Scleroderma), 굿패스처 신드롬(Goodpasture syndrome), 베제트병(Becet's Disease), 크론병(Crohn's Disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis), 포도막염(Uveitis), 혈소판 감소성 자반증(Thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 소아 당뇨병(Diabetes), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune Anemia), 크라이로글로불린증(Cryoglobulinemia), 부신백질이영양증(ALD), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 등이 있다.

20

IV. 약제학적 조성물

본 발명의 약제학적 조성물은 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진

25

그룹으로부터 2종 이상 선택된 활성 성분을 치료학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체에 혼입시킨 형태로 제공하는 것이 바람직할 것이다.

본 발명의 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 “약제학적으로 허용되는 담체” 라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서 본 발명의 약제학적 조성물은 국부, 경구, 비경구, 안내, 경피, 직장, 장관 등으로 투여될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 본 발명의 명세서에서 사용된 용어 “비경구” 는 피하, 비내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 심장내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

한 양태로서, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구적 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를

증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspension)으로 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수 양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.

본 발명의 바람직한 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 비휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.

앞서 제조된 액상 조성물은 박테리아 포획 필터 등을 통한 여과에 의해 살균제 또는 방사를 혼입시켜 대개 살균된다. 살균된 조성물은 예를 들면 동결건조에 의해 고형 조성물을 수득하여 고형화시킬 수 있으며, 사용시에 이를 무균수 또는 무균 희석액에 용해시킨다.

본 발명에 따른 활성 성분을 함유한 약제학적 조성물은 실온에서의

안정성을 증가시키고, 값비싼 저온 저장의 필요성을 줄이며, 저장 수명(shelf-life)을 연장하기 위해 동결건조시킬 수 있다. 동결건조 공정은 동결, 일차 건조 및 이차 건조의 연속 단계로 이루어질 수 있다. 조성물을 동결시킨 후의 이차 건조 공정은 압력을 강하하고 수증기의 승화를 위해 가열하는 것이다. 이차 건조 단계는 건조물로부터 흡수된 잔여 수분을 증발시키는 것이다.

본 발명의 약제학적 조성물과 관련하여 사용되는 용어 “치료학적 유효량”은 본 발명의 조성물이 적용되는 면역질환에 대하여 목적인 개선 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 활성 성분의 양을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서 치료학적 유효량은 환자의 연령, 성별, 적용부위, 투여회수, 투여시간, 제형, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있지만, 예를 들면 $0.01\sim 1000\mu\text{g/kg/일}$, 보다 바람직하게는 $0.1\sim 500\mu\text{g/kg/일}$, 가장 바람직하게는 $1\sim 100\mu\text{g/kg/일}$ 로 투여한다.

본 발명은 하기 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명될 것이다. 그러나 이들 실시예는 단순히 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명할 것이다.

하기 실시예 1은 LAG3에 관한 것이며, LAG3/Fc 또는 LAG3-LAG3/Fc의 아미노산 서열 및 코딩 DNA 서열 그리고 이들의 제조에 이용된 프라이머 서열들을 하기 표 1에 요약하였다.

<표 1>

LAG3-LAG3/Fc 서열 및 이의 제조에 이용된 프라이머 서열

서열 명칭	서열 번호	설 명
Oligo-LAG3-F- <i>Eco</i> R I	1	LAG3 세포외역 가용성 부위의 5' 말단, <i>Eco</i> R I 포함
Oligo-LAG3-R-5P	2	LAG3 세포외역 가용성 부위의 3' 말단
Oligo-LAG3-F-5P	3	LAG3 세포외역 가용성 부위의 5' 말단
Oligo-LAG3-R- <i>Spe</i> I	4	LAG3 세포외역 가용성 부위의 3' 말단, <i>Spe</i> I 포함
hIgG-F- <i>Spe</i> I	5	IgG 힌지 5' 말단 <i>Spe</i> I 포함
hIgG-R- <i>Xba</i> I	6	IgG 3' 말단 <i>Xba</i> I 포함
LAG3/Fc 코딩 DNA	7	-
LAG3/Fc 단백질	8	-
LAG3-LAG3/Fc 코딩 DNA	9	-
LAG3-LAG3/Fc 단백질	10	-

5 <실시예 1>

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물의 제조

A. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 제조

a. LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편

LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편은, 제한효소
 10 *Eco*R I의 인식서열과 리더서열(서열번호 8의 펩타이드 1-22)의
 코딩서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 1의
 뉴클레오타이드)와, 제한효소 *Spe* I의 인식서열과 상기 세포외역 가용성
 부위의 3' 말단 서열을 코딩하는 안티센스 서열(서열번호 7의
 뉴클레오타이드)을 갖는 다른 프라이머(서열번호 4번의 뉴클레오타이드)를

사용하여 중합효소 연쇄반응으로 생성시켰다. 이 반응을 위한 주형 cDNA는 건강한 성인의 단핵구 세포(T림프구)에서 추출한 mRNA를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였다.

건강한 성인의 혈액을 채취하여 알피엠아이-1640[RPMI-1640(Gibco BRL, USA)] 배지와 1:1로 희석하고 이를 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque(Amersham, USA)]을 사용하여 밀도구배 원심분리(density-gradient centrifugation)하여 상부에 형성된 T 림프구 세포층을 얻었다. 그리고 알피엠아이-1640 배지로 3회 세척하고 여기에 10% 우태아혈청(FBS, Gibco BRL, USA) 함유 알피엠아이-1640 배지를 가하여 T 림프구 세포가 5×10^5 개/ml로 하고, 파이토헤마글루티닌-엠[Phytohemagglutinin-M (Calbiochem, Germany)]을 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하여 자극하였다.

mRNA는 트리리에이젠트 [Tri-Reagent(MRC, USA)] mRNA 분리 키트를 이용하여 순수 분리하였다. 우선 인간 T 림프구 2×10^7 개의 세포를 인산완충 생리식염수용액(phosphate buffered saline, PBS, pH7.2)으로 3회 세척한 후 1ml 트리리젠트로 수차례 섞어서 RNA를 용해시켰다. 이 튜브에 0.2ml 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 강하게 흔들어준 후, 실온에서 15분간 방치한 다음, 4℃에서 15,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 1.5ml 튜브로 옮기고 0.5ml 이소프로판올(isopropanol)을 첨가한 후, 4℃에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후, 침전물에, 75% 에탄올(Ethanol)-25% 디이피씨[DEPC(Sigma, USA)]를 처리한 3차 증류수를 1ml 첨가하여 2~3회 섞은 후 4℃에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 완전히 제거하고 공기 중에서 건조시켜 잔여 에탄올을 제거한 후 RNA를 디이피씨를 처리한 3차 증류수 $50\mu\text{l}$ 로 녹였다.

cDNA 합성은 1.5ml 튜브에 정제된 $2\mu\text{g}$ mRNA와 $1\mu\text{l}$ 올리고 디티[oligo dT(dT30, Promega, USA)] 프라이머를 $10\mu\text{M}$ 의 농도로 혼합하고, 70℃에서 2분간 가열한 후, 얼음에 넣어 2분간 냉각시켰다. 이 혼합물에 200U 엠-

엠엘브이(M-MLV) 역전사효소[reverse transcriptase(Promega, USA)], 10 μ l 5 \times 반응완충용액(reaction buffer) [250mM 트리스-에이치씨엘(Tris-HCl), pH 8.3, 375mM 염화칼륨(KCl), 15mM 염화마그네슘(MgCl₂), 50mM 디티티(DTT)], 1 μ l 디엔티피[dNTP(각각 10mM의 농도, Takara, Japan)]를 넣고 디이피씨를 처리한
5 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다.

b. 면역글로블린 G1의 Fc 단편을 코딩하는 DNA 단편

면역글로블린 G1의 Fc 단편을 코딩하는 DNA 단편은, 제한효소 *Spe* I의
10 인식서열과 IgG1의 힌지의 5' 말단을 코딩하는 서열을 갖는 한 프라이머(서열번호 5의 뉴클레오타이드)와 *Xba* I의 인식서열과 IgG1 Fc의 3' 말단을 코딩하는 안티센스의 서열을 갖는 다른 프라이머(서열번호 6번의 뉴클레오타이드)를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 생성시켰다. 이 반응을 위한 주형 cDNA는 회복기에 있는 원인 불명의 열 환자의 말초 혈액세포(B
15 림파구)에서 추출한 mRNA를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였다.

c. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물

상기 생성된 LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편과 면역글로브린 G1의 Fc 단편을 코딩하는 DNA 단편을 제한효소 *Spe* I으로
20 소화시키고 티포 디엔에이 라이게이즈(*T*₄ DNA ligase, USB, USA)를 이용하여 결합시킴으로써 단순 단량체 형태의 LAG3/Fc 유전자를 제작하였다.

d. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 클로닝

25 상기 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 제한효소 *Eco*RI과 *Xba*I으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝

벡터(Stratagene사 제품) 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II(+)]의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 전체 코딩 영역 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다(서열번호 7). 이때 생성된 융합 단백질은 단순 융합된 단량체 단백질로서 LAG3/Fc라 명명하였고, 이들의 추정 아미노산 서열은 서열번호 8에 해당한다.

B. 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 제조

LAG3의 세포외역 가용성 부위가 연쇄체(concatamer)의 형태를 갖는 융합된 유전자를 만들기 위해, 즉 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 만들기 위해, 제한효소 EcoRI의 인식서열과 리더서열(서열번호 8의 펩타이드 1-22)의 코딩서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 1의 뉴클레오타이드)와 상기 세포외역 가용성 부위의 3' 말단 서열을 코딩하는 안티센스 서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 다른 프라이머(서열번호 2의 뉴클레오타이드)를 사용하여 하나의 LAG3 세포외역 가용성 부위의 단편을 증폭하였고, 또한 LAG3 세포외역 가용성부위의 리더 서열이 종료되는 부위(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 3의 뉴클레오타이드)와 제한효소 XbaI의 인식서열과 IgG1 Fc의 3' 말단을 코딩하는 안티센스 서열을 갖는 다른 프라이머(서열번호 6의 뉴클레오타이드)를 사용하여 다른 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 단편을 증폭하였다. 이 반응은 상기 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 주형으로 사용하였다.

중합효소 연쇄반응은 1 μ l 1차 cDNA, 2U 피에프유(Pfu) DNA 중합효소[polymerase (Stratagene, USA)], 10 μ l 10X 반응완충용액(reaction buffer) [200mM 트리스-HCl, pH8.75, 100mM 황산암모늄 [(NH₄)₂SO₄], 100mM

염화칼륨(KCl), 20mM 염화마그네슘(MgCl₂), 1% 트리톤(등록상표 Triton) X-100, 1mg/ml 우혈청알부민(BSA), 3 μ l 프라이머1(10 μ M), 3 μ l 프라이머2(10 μ M), 2 μ l 디엔티피(dNTP, 각각 10mM)를 넣고 3차 증류수로 100 μ l가 되도록 첨가한 후 실시하였다. 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 처리한 다음 95 $^{\circ}$ C 1분, 58 $^{\circ}$ C 1분30초, 72 $^{\circ}$ C 1분30초씩 31회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C 15분간 더 반응시켜 중합효소 연쇄반응 산물이 완전한 평활 말단(blunt end)이 되도록 하였다.

중합효소 연쇄반응 산물들을 0.8% 아가로즈 젤(agarose gel)에 전기영동한 후, 큐엑스 투 젤 추출 키트[Qiaex II gel extraction kit(Qiagen, USA)]를 이용하여 순수 분리하였다. 순수분리된 중합효소 연쇄반응 산물들을 제한효소 BamHI으로 처리한 후 페놀/클로로포름 추출 방법으로 순수 분리하였다. 이어서, BamHI으로 처리된 두 종류의 DNA 단편을 라이게이즈로 결합시켰다.

C. 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 클로닝

상기 제조된 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 제한효소 *EcoRI* 과 *XbaI* 으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터인 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KSII(+), Stratagene, USA]의 *EcoRI* /*XbaI* 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 전체 코딩 영역 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다(서열번호 9). 이때 생성된 융합 단백질은 연쇄 융합된 단량체 단백질로서 LAG3-LAG3/Fc라 명명하였고, 이들의 추정 아미노산 서열은 서열번호 10에 해당한다.

벡터로 사용할 10 μ l 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II (+), Stratagene, USA]]를 15U *EcoRI*과 15U *XbaI*, 5 μ l 10X 반응완충용액(reaction buffer) [100mM 트리스-HCl, pH 7.5, 100mM 염화마그네슘(MgCl₂), 10mM 디티티 (DTT), 500mM 염화나트륨(NaCl)], 5 μ l 0.1%

우혈청알부민[BSA(Takara, Japan)]을 섞은 후, 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켜 DNA를 소화시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 겔에 전기영동한 후, 큐엑스 투 겔 추출 키트 [Qiaex II gel extraction kit(Qiagen, USA)]로 순수 분리하였다.

5 EcoRI과 XbaI으로 소화된 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II(+), Stratagene, USA] 100ng과 제한효소로 소화시킨 20ng의 중합효소 연쇄반응 산물을 혼합하고 0.5U 티포(T4) DNA 라이게이즈[ligase(Amersham, USA)], 1 μ l 10X반응완충용액(reaction buffer) [300mM 트리스-에이치씨엘(Tris-HCl), pH 7.8, 100mM 염화마그네슘(MgCl₂),
10 100mM 디티티(DTT), 10mM 에이티피(ATP)]를 넣은 후 3차 증류수로 10 μ l가 되도록 첨가한 후 16 $^{\circ}$ C 수조(water bath)에서 16시간 동안 반응시켰다.

한편, 대장균[E. coli Top10(Novex, USA)]을 리비덤 클로라이드(RbCl, ribidium chloride, Sigma, USA)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 앞서 제조된 플라스미드로 형질전환시켜 암피실린(ampicillin, Sigma,
15 USA)을 50 μ g/ml 함유한 엘비(LB) 고체 배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양하였다. 생성된 콜로니들을 암피실린이 50 μ g/ml 함유된 엘비(LB) 액체배지 4ml에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 진탕 배양하였다. 이 중 1.5ml을 샘브룩(Sambrook J) 등의 문헌(Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.25-1.31, p1.63-1.69, p7.26-7.29, 1989)에
20 기술된 알칼리 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드를 소량 추출한 후, EcoRI과 XbaI으로 소화시켜 클로닝의 유무를 확인하였다.

전체 코딩영역 서열은 다이데옥시 체인 터미네이션 [Dideoxy chain termination (Sanger F. et al. PNAS USA, 1977, vol.74, p.5483)] 법을 이용한 다음과 같은 DNA 서열화 방법에 의해 확인하였다. 상기의 알칼리
25 분해법으로 추출한 플라스미드와 시퀀네이즈(등록상표 Sequenase ver. 2.0, Amersham, USA) 및 35S 디에이티피(dATP, Amersham, USA)를 사용하여 제품

사용법에 준하는 방법으로 DNA 서열화 반응을 진행시켰다. 6% 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)에 위의 시료를 로딩(loading)하고 전압을 1800~2000V 사이로 유지하여 젤의 온도를 50℃로 유지하면서 2시간 전기영동한 후, 건조시킨 다음 엑스레이 필름(Kodak, USA)에 2일 동안 노출시킨 후 DNA 염기 서열을 관독하였다.

<실시예 2>

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물의 제조

10 다른 단백질인 TNFR1, TNFR2, CD2 또는 CTLA4의 단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질은 전술한 실시예 1과 동일한 절차에 따라 제조할 수 있다. 보다 자세한 제조방법은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허공개 WO 2003/010202호를 통하여 확인할 수 있다. 관련된 TNFR1, TNFR2, CD2 또는 CTLA4 서열들을 아래 표 2에
15 나타내었다.

<표 2>

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질 및 이의 코딩 서열

서열 명칭	서열번호
TNFR2/Fc 코딩 DNA	11
TNFR2/Fc 단백질	12
TNFR2-TNFR2/Fc 코딩 DNA	13
TNFR2-TNFR2/Fc 단백질	14
CD2/Fc코딩 DNA	15
CD2/Fc 단백질	16
CD2-CD2/Fc 코딩 DNA	17
CD2-CD2/Fc 단백질	18
CTLA4/Fc 코딩 DNA	19
CTLA4/FC 단백질	20
CTLA4-CTLA4/FC 코딩 DNA	21
CTLA4-CTLA4/FC 단백질	22
TNFR1/Fc 코딩 DNA	23
TNFR1/Fc 단백질	24
TNFR2-TNFR1/Fc 코딩 DNA	25
TNFR2-TNFR1/Fc 단백질	26

5

<실시예 3>

단순/연쇄 융합된 이량체 LAG3 융합 단백질의 발현 및 정제

차이니스 햄스터 난소 세포주 케이원(CHO-K1, ATCC CCL-61, Ovary, Chinese hamster, Cricetulus griseus)에서 융합 단백질을 발현시키기 위하여,

LAG3-LAG3/Fc 융합 유전자를 포함한 블루스크립트 케이에스투 플러스 플라스미드를 형질 전환된 대장균에서 추출한 후, 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 소화시켜 얻은 LAG3-LAG3/Fc 단편을 동물세포 발현 벡터인 피씨알쓰리(pCR™3, Invitrogen, USA) 플라스미드의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하여, 재조합 발현
5 플라스미드를 pLAG33Ig를 제조하였다(도 3). 이 플라스미드를 pLAG33-Top10'이라 명명하였고, 2004년 1월 13일자로 국제기탁기관인 한국미생물보존센터 (KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361-221 유림빌딩 소재)에 기탁번호 KCCM-10556로 기탁하였다.

형질 감염은 상기 LAG3-LAG3/Fc 융합 유전자를 포함한 플라스미드
10 pLAG33Ig DNA를 지브코 비알엘(Gibco BRL, USA)사의 리포펙타민(Lipofectamine™) 시약과 혼합함으로써 수행하였다. $1 \sim 3 \times 10^5$ 세포/구의 농도의 차이니즈 햄스터 난소 세포주 케이원(CHO-K1) 세포를 6구 조직 배양판 (six-well tissue culture plate, Nunc, USA)에 접종하고 10% 우태아혈청(FBS)을 함유한 디엠이엠(DMEM) 배지에서 세포가 50~80%가 되도록
15 배양한 후, 혈청이 없는 디엠이엠(DMEM) 배지에서 플라스미드 pLAG33Ig DNA를 $1 \sim 2 \mu\text{g}$ 취하고, 리포펙타민(Gibco BRL, USA)을 $2 \sim 25 \mu\text{l}$ 취하여 상온에서 15~45분간 반응시킨 DNA-리포솜 혼합체(Liposome complex)를 세포 배양판에 첨가시켰다. 5시간동안 배양한 후 혈청이 20%가 함유된 디엠이엠(DMEM) 배지를 첨가하여 18~24시간 배양하였다. 최초 형질 감염 후에 세포를 1.5
20 mg/ml 의 제네티신(Geneticin, G418, Gibco BRL, USA)이 첨가된 10% 우태아혈청 디엠이엠(DMEM) 배지에서 3주간 배양하고, 형성된 집락을 분리하여 증폭 배양하였다. 융합 유전자의 발현 여부는 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항 인간 면역글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 사용한 효소 면역 검사법(ELISA)을 통해 검사하였다.

25 효소 면역 검사법(ELISA)은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, 1mg/ml 염소 항 인간 면역 글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG,

KPL, USA)을 0.1M 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)에 1:2000으로 희석한 후, 96구 효소 면역 검사판(96-well flexible plate, Falcon, USA)에 100 μ l씩 분주하고 랩으로 봉한 후 4℃에서 16시간 이상 방치하여 항체가 검사판 표면에 코팅되게 하였다. 이를 세척완충용액(washing buffer) [0.1% 트윈-20(Tween-20) 함유, 1X 인산완충 생리식염수(PBS, Phosphate buffered saline)]으로 3회 세척한 후 희석용액[(diluent buffer) 1X 인산완충 생리식염수 48.5ml, 우태아 혈청 1.5ml, 트윈-20 50 μ l]을 180 μ l씩 분주하였다. 첫 구(well)에 배양한 상층액 20 μ l를 넣은 후 마이크로 피펫 (micropipette)을 이용하여 연속적으로 희석하였고, 양성 대조군으로 0.01 μ g/ μ l 인간 면역글로블린(human IgG, Sigma, USA)을, 음성 대조군으로 형질감염되지 않은 차이니스 햄스터의 난소 케이원(CHO-K1) 세포의 배양액을 사용하여 동일하게 희석하였다. 희석이 끝난 96구 효소 면역 검사판(Falcon, USA)을 호일로 싸서 37℃에서 1시간 30분간 반응시킨 후, 세척용액으로 3회 세척하였다. 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항-인간 면역글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 희석용액으로 1:5000 희석한 다음 이를 100 μ l씩 분주하고 호일로 싼 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척용액으로 3회 세척한 후 티엠비 퍼옥시데이즈 시스템(TMB microwell peroxidase substrate system, KPL, USA)을 이용하여 발색시키고, 흡광기(microplate reader, Bio-RAD, Model 550, Japan)로 파장 630nm에 대한 흡광도를 측정하여 발현 여부를 확인하였다.

이렇게 제조된 형질전환체(transfectant)가 생산한 융합 단백질을 정제할 목적으로 무혈청배지(serum free media) 중 CHO-S-SFM II (Gibco BRL, USA)에 적응시키기 위하여 다음의 과정으로 진행하였다. 약 3×10^5 개의 세포를 6구판(6-well plate)에 접종한 후 16시간동안 5% CO₂ 37℃ 배양기에서 배양하여 정착시킨 후 현미경 하에서 약 30~50%의 면적에 세포가 부착된 것을 확인하고 10% 우태아 혈청 함유 DMEM와 CHO-S-SFM II의 비율을 8:2가 되도록 배지를 교체하여 배양하였다. 이 비율로 3회 계대 배양한 후, 각각 6:4의

비율로 3회, 4:6의 비율로 3회, 3:7의 비율로 3회, 2:8의 비율로 3회, 및 1:9의 비율로 3회 계대 배양한 후 최종적으로 100% CHO-S-SFM II 배지에서 계대 배양하여, 이의 발현량을 효소 면역 검사법을 이용하여 측정하였다.

이 세포들을 우혈청배지가 없는 CHO-S-SFM II(Gibco BRL, USA) 배지에서 대량 배양후 각각의 용합 단백질을 함유한 배양액을 200× g, 12분간 원심분리하여 세포 찌꺼기들을 완전히 제거하고 프로테인 에이 컬럼(HiTrap protein A column, Amersham, USA)을 이용한 다음의 방법으로 순수 분리하였다. 20mM 인산화 나트륨(Sodium phosphate, pH 7.0, Sigma, USA)을 1ml/min의 속도로 2분간 통과시킨 후, 10ml 배양액을 동일한 속도로 컬럼을 통과시켜 프로테인 에이에 용합 단백질이 결합하도록 하였다. 20mM 인산화 나트륨(pH 7.0)을 2분간 동일 속도로 통과시켜 세척한 후, 0.1M 시트르산($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, citric acid, pH 3.0, Sigma, USA)을 3분간 동일속도로 통과시키면서 500 μ l씩 1.5ml 튜브에 순차적으로 추출물을 분주하였다. 이를 1M 트리스(Tris, pH 11.0, USB, Sigma)를 이용하여 pH 7.0으로 적정하였으며 각 튜브의 용합 단백질의 존재 유무는 상기에 기술한 효소면역 검사법(ELISA)을 통하여 확인하였다. 순수 분리한 용합 단백질은 센트리콘 30(Centricon 30, Amicon, USA)을 사용하여 4℃에서 2000× g, 30분간 원심분리하여 농축하였다.

20 <실시예 4>

단순/연쇄 융합된 이량체 단백질 CD2, CTLA4, TNFR의 발현 및 정제

단순/연쇄 융합된 이량체 단백질 CD2, CTLA4, TNFR의 발현 및 정제는 전술한 실시예 3과 동일한 절차에 따라 제조할 수 있었다. 보다 자세한
25 방법은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허공개 WO 2003/010202호를 통하여 확인할 수 있다. 한편, 이로부터 수득한 제조합 발현

플라스미드는 각각 pCD22Ig(도 1), pCT44Ig(도 2), pTR2Ig-Top'(도 4)이라 명명하였다.

아울러, 실시예 3 및 실시예 4에 따라 순수 정제된 단백질들이 목적한 단순 융합된 이량체 단백질 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 및 연쇄 융합된 이량체 단백질 [CD2-CD2/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂가 맞는지 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였고 (도 5a), 마찬가지로 [TNFR1/Fc]₂, [TNFR2/Fc]₂, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂에 대해서도 SDS-PAGE를 실시하였다(도 5b).

10 <실시예 5>

단순 융합된 이량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 처리에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

15 A. 단순 융합된 이량체 단백질의 단독 처리에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

발열 환자의 B 림프구에 엡스타인-바 바이러스(Ebstein-Barr virus)를 형질감염시켜 만든 B 림프구 세포주인 WT100B1S를 T 림프구의 항원제시세포로 사용하기 위하여 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 배양하였다. 이를 2,000rpm에서 2분간 침전시킨 후 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 이 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 다시 푼 다음 3,000 라드(rd)의 감마선(γ -ray)으로 조사(irradiation)시켰다.

T 림프구는 건강한 사람의 혈액에서 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque (Amersham, USA)]을 이용하여 분리한 다음 2.0×10^6 세포/ml이 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640으로 배양하였다.

25 1차 혼합 림프구 반응[Primary Mixed Lymphocyte Reaction(MLR)]을 실행하기 위하여 상기 WT100B1S와 T 림프구를 150mm 세포 배양 접시에 각각

15ml씩 섞고 3일간 배양한 후에 15ml의 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640을 첨가하여 3일간 더 배양하였다. 총 6일간 배양한 후에 상기의 방법대로 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque (Amersham, USA)]을 이용하여 살아있는 T 림프구를 순수 분리하였다. 이렇게 분리한 림프구는 45% 우태아 혈청, 45% 알피엠아이(RPMI) 1640, 10% 디엠에스오(DMSO)로 만든 배지를 이용하여 얼린 후 액체질소에 보관하였다.

1차 혼합 림프구 반응을 시킨 T 림프구를 2차 혼합 림프구 반응을 실시하기 위하여 녹인 후, 알피엠아이(RPMI) 1640 배지를 이용하여 2회 세척하였고 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 3.0×10^5 cells/ml이 되도록 하였다.

항원제시세포로 사용할 WT100B1S는 상기의 방법대로 새로 배양한 후 3,000라드의 감마선(γ -ray)으로 조사(irradiation)시켜 준비하고 7.5×10^4 cells/ml이 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 준비하였다. 이렇게 준비된 WT100B1S를 100 μ l씩 96구 평판 세포 배양판에 넣고 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂, [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂을 각각 최종 농도 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} μ g/ml가 되도록 혼합한 후 상기 1차 혼합 림프구 반응을 시킨 T 림프구를 100 μ l씩 첨가하였다. 이를 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 2일간 배양한 후, 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640을 100 μ l 첨가하고 2일간 더 배양하였다. 총 4일간의 배양 중 마지막 6시간은 ³H-타이미딘 [thymidine(Amersham)]을 1.2 μ Ci/ml가 되도록 첨가하여 배양하였다.

배양이 종료된 후 96구 세포 배양판을 4 $^{\circ}$ C, 110 \times g, 10분간 원심 분리하여 T-림프구를 침전시켜 상층액을 제거하였고, 200 μ l 1X 인산완충용액으로 세척하였다. 동일한 조건으로 원심 분리한 후 인산완충용액을 제거하고, 남아있는 ³H-타이미딘 [thymidine (Amersham)]을 제거하기 위해 차가운 200 μ l 10% 티씨에이 [trichloridic acid(TCA, Merck)]를

첨가하고 2분간 흔들어 준 후 5분간 4℃에서 반응시켰다.

위와 동일한 조건에서 원심 분리한 후 상층액을 제거하였으며 차가운 200 μ l의 70% 에탄올을 첨가한 후 4℃에서 5분간 방치하여 T 림프구를 고정하였다. 원심 분리한 후 상층액을 제거하였고, 상기의 방법과 동일한
5 조건으로 10% 티씨에이(TCA)를 처리하여 남아있는 ³H-타이미딘 [thymidine (Amersham)]을 완전히 제거하였다.

여기에 100 μ l의 2% 에스디에스 [SDS(pH 8.0)]/0.5N 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하고 37℃에서 30분간 반응시켜 세포 용해를 실시하였고, 25℃ 110×g 10분간 원심 분리하여 T 림프구를 침전시키고 상층액
10 중 50 μ l를 96구 샘플판(Wallac)으로 옮겼다. 상층액에 1.5배의 옵티페이스 슈퍼믹스 [OptiPhase SuperMix(Wallac)]를 넣어 5분간 흔들어 준 후 액체 흡광기 [1450 MicroBeta TriLux microplate liquid scintillation and luminescence counter(Wallac)]를 이용하여 ³H에 대한 cpm값을 측정하여 T 림프구의 증식 여부를 확인하였다(도 6a).

15 도 6a에 나타낸 바와 같이 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂, [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂은 모두 T 림프구의 증식을 억제하였으며, 이들 중에서도 [CTLA4/Fc]₂와 [LAG3/Fc]₂가 [TNFR2/Fc]₂와 [CD2/Fc]₂에 비하여 보다 효과적으로 T 림프구의 증식을 억제하였다.

20 B. 단순 융합된 이량체의 복합 투여에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

상기 실시예 5의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [LAG3/Fc]₂를 이용하여 T 림프구의 증식 억제 효과를
25 확인하였다(도 6b).

도 6b에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2/Fc]₂,

[CTLA4/Fc]₂ + [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [LAG3/Fc]₂가 모두 T 림프구의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다. 또한, 단순 융합된 이량체 단백질을 복합 투여하는 경우가 단독 투여하는 경우 보다 T 림프구의 증식을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

5

C. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

상기 실시예 5의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 이량체 단백질 대신에 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂,
10 [LAG3-LAG3/Fc]₂를 이용하여 T 림프구의 증식 억제 효과를 확인하였다(도 6c).

도 6c에 나타낸 바와 같이 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂가 모두 T 림프구의 증식을 억제함을 확인할 수 있었으며, 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여할 때 보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질을 단독 투여할 때에 T 림프구의 증식이 보다 효과적으로
15 억제됨을 확인할 수 있었다.

D. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합 투여에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

상기 실시예 5의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된
20 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [LAG3-LAG3/Fc]₂를 이용하여 T 림프구의 증식 억제 효과를 확인하였다(도 6d).

도 6d에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [LAG3-LAG3/Fc]₂가 모두 T 림프구의 증식을 억제함을 확인할 수 있었으며, 연쇄
25 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 경우가 단독 투여한 경우보다 T 림프구의

증식을 더욱 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 아울러, 이들 중에서도 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [LAG3-LAG3/Fc]₂ 가 T 림프구 증식 억제 효과가 가장 뛰어남을 확인할 수 있었다.

5 <실시예 6>

단순 융합된 이량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 처리에 따른 콜라겐 유도 관절염의 완화 효과 확인

10 A. 단순 융합된 이량체 단백질의 단독 처리에 따른 관절염 완화 효과 확인

아스로젠 씨아이에이 보조제(Arthrogen-CIA adjuvant, Chondrex, USA) 중의 0.05M의 아세트산에 2mg/ml의 농도로 녹인 타입 II 콜라겐을 DBA/1 생쥐 한 마리당 꼬리에 100 μ g씩 주입하여 콜라겐 유도 관절염(CIA; Collagen Induced Arthritis)을 발병시켰다. 부스팅(Boosting)은 3주 후에 하였으며 불완전 프로인트 보조제(incomplete Freund's adjuvant, Difco, USA)를 이용하였다.

DBA/1 생쥐에 타입 II 콜라겐 100 μ g으로 면역화시킨 후에 3-4 주 후에 관절염 증상이 나타났다. 증상이 나타난 후 3-5일이 지나면 생쥐의 발이 빨갛게 부어오르며, 염증성 관절염(inflammatory arthritis)은 3-4주 이상 지속되었으며, 염증이 약화되어도 관절은 영구히 경직되었다. 관절염 심도의 주관적 척도를 나타내는 표 3에 근거하여 1주일 2-3회 측정하였다(각 실험군에서 5마리 생쥐에서의 평균값을 구함).

<표 3>

관절염의 심도 스코어

심도스코어	병의 경과 상태
0	홍진과 종기가 없음
1	홍진과 작은 종기가 발목관절 또는 족근골에 한하여 나타난다
2	홍진과 작은 종기가 발목관절에서 족근골까지 번진다
3	홍진과 작은 종기가 발목관절에서 척골관절까지 번진다
4	홍진과 심한 종기가 발목관절, 다리, 발가락까지 확장된다

5 관절염에 걸린 생쥐에 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂, [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 또는 [LAG3/Fc]₂를 각각 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 복강내 투여하였다. CD2/Fc, TNFR2/Fc, CTLA4/Fc 그리고 LAG3/Fc를 실험군당 5마리의 생쥐에 19일 내지 45일동안 2일에 한번씩 10 μ g을 주사하고 관절염 심도의 변화를 관찰하였다(도 7a).

10 도 7a에 나타낸 바와 같이 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우가 대조군으로 인산완충용액을 주사한 생쥐에서 나타난 관절염 심도의 정도와 비교할 때 45일 기준으로 약 26~38% 감소된 효과를 보였다.

15 B. 단순 융합된 이량체 단백질의 복합 투여에 따른 관절염 완화 효과 확인

 상기 실시예 6의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [LAG3/Fc]₂를 이용하여 관절염 완화 효과를 확인하였다(도 7b).

20 도 7b에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2/Fc]₂,

[CTLA4/Fc]₂ + [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ + [LAG3/Fc]₂가 관절염을 완화시키는 것을 확인할 수 있었으며, 단순 융합된 이량체 단백질을 복합 투여하는 경우가 단독 투여하는 경우보다 관절염을 완화시키는 효과가 뛰어나함을 확인할 수 있었다.

5

C. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여에 따른 관절염 완화 효과 확인

상기 실시예 6의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 이량체 단백질 대신에 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂,
10 [LAG3-LAG3/Fc]₂를 이용하여 관절염 완화 효과를 확인하였다(도 7c).

도 7c에 나타낸 바와 같이 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂가 관절염을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다. 이 때, 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우보다 우수하고 단순 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 경우와 비슷한 정도의 관절염 완화
15 효과를 발휘하였다.

D. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합 투여에 따른 관절염 완화 효과 확인

상기 실시예 6의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된
20 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [LAG3-LAG3/Fc]₂를 이용하여 관절염 완화 효과를 확인하였다(도 7d).

도 7d에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [TNFR2-TNFR2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ + [LAG3-LAG3/Fc]₂가 관절염을 완화시키는 것을 확인할 수 있었으며 특히, 연쇄 융합된
25 이량체 단백질을 복합 투여하는 경우가 단독 투여하는 경우 보다 관절염 완화

효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

<실시예 7>

단순 융합된 이량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독
5 또는 복합 처리에 따른 이식편대 숙주질환 치료 효과 확인

A. 단순 융합된 이량체 단백질의 이식편대 숙주질환 치료효과

본 발명에서 사용한 마우스는 몸무게 20~25g의 8~12주령 암컷 마우스
C57BL/6과 BDF1[(C57BL/6 x DBA/2)F₁]이며, 멸균된 사육장(filter-top
10 microisolator)에서 사육하였다. 수령 마우스에게는 공여 마우스의 비장
세포를 주입하기 하루 전에 박트림(bactrim)을 투여하였다. BDF1 (H-2Kb/d)
수령 마우스는 연세대학교의 미생물학 교실로부터 전신에 700cGy의 감마선을
조사(irradiation)받은 것을 이용하였다. 공여 마우스로부터 수득한 비장
세포는 10% 알피엠아이(RPMI)에 1%의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한
15 배지에 준비하였고, 세포는 400g에서 10분간 원심분리하여 수득하였다.

이식편대 숙주질환을 유발하기 위하여 앞서 감마선에 의해 조사된 BDF1
수령 마우스에게 동종 공여 마우스인 C57BL/6 마우스(H-2Kb)의 살아있는 비장
세포(25×10^6 개)를 역방향 주입 방법을 이용하여 이식하였다.

상기 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 단순 융합된 이량체
20 단백질인 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 각각을 인산완충용액(PBS)에
200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 여기서,
대조군 수령 마우스에게는 PBS를 투여하였으며, 상기 수령 마우스들의
생존율을 비교하기 위해서 격일로 몸무게를 측정하여 생존율을 계산하였다(도
8a).

25 도 8a에 나타낸 바와 같이 대조군 수령 마우스의 경우 이식편대
숙주질환으로 인하여 체중이 빠르게 감소하였고, 공여 마우스의 활성화된 T

림프구의 증식으로 인하여 수령 마우스의 비장 세포 수가 감소하였다. 결국은 비장 세포를 수령 마우스로 이식한지 2주 정도 경과한 후에 본 발명에 사용된 모든 대조군 마우스가 심각한 체중 감소를 나타냈으며, 사망에 이르렀다. 한편, 단순 융합된 이량체 단백질인 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂를 각각 단독 투여받은 마우스의 경우에는 모두 이식편대 숙주질환에 의한 치사율이 대조군에 비하여 감소하였다. 상기와 같이 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우에 [LAG3/Fc]₂가 약 4주의 생존 기간을 보여서 가장 좋은 면역억제 효과를 나타내었으며, [CTLA4/Fc]₂, [CD2/Fc]₂의 순서로 생존율이 증가하는 결과를 보여주었다.

10

B. 단순 융합된 이량체 단백질의 단독 및 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 각각을 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물 [CD2/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂ 또는 [LAG3/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂를 각각 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8b).

20

도 8b에 나타난 바와 같이 실시예 7의 A에 따른 결과와 비교했을 때 단순 융합된 이량체 단백질을 단독으로 투여한 경우보다는 복합적으로 투여한 경우에 더 높은 생존율이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 특히 [LAG3/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂ 혼합물을 투여한 경우에 개체 전원이 약 40일 이상의 생존기간을 나타냄으로써 이식편대 숙주질환에 의한 치사율을 가장 많이 감소시킴을 보여주었다. 이 결과를 각각 10마리의 마우스에서 평균생존기간을 계산하여 도표화하였으며(표 4), 이러한 결과는 이식편대

25

숙주질환의 치료에는 단순 융합 이량체 단백질을 1종 단독으로 사용하는 것보다는 2종 이상 복합적으로 투여하는 것이 더 좋은 치료효과를 달성할 수 있음을 보여주는 것이다.

5 <표 4>

단순 융합된 이량체 단백질의 단독 및 복합 투여에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역억제제 (mg/kg/일)	공여 마우스	수령 마우스	마리수	생존일수	평균생존일수 ± SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7 ± 1.06
[CD2/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	14~22	15.7 ± 3.37
[LAG3/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	13~26	18 ± 5.12
[CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19~28	23.2 ± 3.49
[CD2/Fc] ₂ + [CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	16~29	23.2 ± 5.71
[LAG3/Fc] ₂ + [CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	21~40	28 ± 7.71

10 C. 단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

(1) CTLA-4의 경우

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [CTLA4/Fc]₂을 인산완충용액(PBS)에 200μg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른

수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8c).

도 8c에 나타난 바와 같이 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [CTLA4/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 26일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 38일의 최대 생존 기간을 보였다. 이 결과를 각각 10마리의 마우스에서 평균생존기간을 계산하여 도표화하였다(표 5). 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

<표 5>

단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역 억제제 (mg/kg/일)	공여 마우스	수령 마우스	마리수	생존일수	평균생존일수 ± SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7±1.06
[CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	14~26	18.4±4.70
[CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19~38	28.2±8.12

15

(2) TNFR2의 경우

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내

투여하였다(도 8d).

도 8d에 나타난 바와 같이 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 20일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 35일의 최대 생존 기간을 보였다. 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

D. [TNFR2-TNFR2/Fc]₂와 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 및 [TNFR2-TNFR1/Fc]₂에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 또는 [TNFR2-TNFR1/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8e).

도 8e에 나타난 바와 같이 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 20일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 30일의 최대 생존 기간을 보였으며, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에는 약 35일의 최대 생존 기간을 보였다. 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다. 또한, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂와 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂는 효과 면에서 거의 유사하였지만, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂가 보다 우수한 면역억제효과를 보유하고 있음을 확인하였다.

E. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [CD2-CD2/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂를
5 각각 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합체인 [CD2-CD2/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ 또는 [LAG3-LAG3/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 각각
10 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8f).

도 8f에 나타낸 바와 같이 대조군 마우스의 경우 상기 결과와 유사하게 약 2주 후에는 100% 치사율을 나타내었다(표 6). 실시예 7의 B에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 경우와 유사하게, 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여보다는 복합 투여가 보다 좋은 생존율을 나타냄을 알 수 있었다. 연쇄
15 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 [CD2-CD2/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂와 [LAG3-LAG3/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂의 경우에 비장세포 주입 후 약 10주까지도 각각 40%와 50%의 생존율을 나타내었다. 이러한 결과들은 이식편대 숙주질환의 치료를 위하여 연쇄 융합된 단백질을 복합적으로 투여하는 것이 더욱 좋은 치료 효과를 달성할 수 있음을 시사하는 것이다.

20

<표 6>

연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환
치료효과 비교

면역억제제 (mg/kg/day)	공여마우스	수령마우스	마리수	생존일수	평균생존일수 ± SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11 ~ 15	13.7±4.3
[CD2-CD2/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19 ~ 28	21.4±5.6
[TNFR2-TNFR2/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	20 ~ 34	26.2±6.1
[TNFR2-TNFR1/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	18 ~ 31	23.6±5.4
[CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19 ~ 38	28.2±8.2
[LAG3-LAG3/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	22 ~ 50	34.6±10.6
[CD2-CD2/Fc] ₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	44이상	100이상
[LAG3-LAG3/Fc] ₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	50이상	100이상

5

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질은 모두 T 림프구의 활성화를 억제함을
확인할 수 있었다. 특히, 단순 융합된 이량체 단백질 보다는 연쇄 융합된
이량체 단백질의 억제 효과가 보다 우수하였다. 또한, 단순 융합된 이량체
단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질은 단독 투여 보다는 복합 투여하는
10 경우에 T 림프구의 활성화를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

특허청구범위

1. MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질,
공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와
5 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의
결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을
활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용
약제학적 조성물.

10 2. 제 1항에 있어서, 상기 MHC Class II 분자와 CD4의 결합을 차단할
수 있는 물질은 (1) MHC Class II 분자에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc
단편의 힌지 부위에 LAG3의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순
융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지
부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4)
15 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 LAG3의 세포외역
가용성 부위의 N-말단에 또 다른 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이
결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체
단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된
이량체 단백질 및 (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로
20 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용
약제학적 조성물.

3. 제 1항에 있어서, 상기 공조자극 분자는 B7, CD154, CD70, OX40L,
ICOS-L, 4-1BBL, HVEM, FASL, PDL이고, 이들의 수용체는 각각 CD28과 CTLA-4,
25 CD40, CD27, OX40, ICOS, 4-1BB, LIGHT, FAS, PD-1인 것을 특징으로 하는
면역질환 치료용 약제학적 조성물.

4. 제 3 항에 있어서, 상기 B7 분자와 CD28 의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) B7 에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CTLA4 의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 CTLA4 의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 CTLA4 의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

5. 제 1항에 있어서, 상기 부착 분자는 LFA-3, ICAM-1, VCAM-1이고, 이들의 수용체는 각각 CD2, LFA-1, VLA-4인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

6. 제 5 항에 있어서, 상기 LFA-3 와 CD2 의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) LFA-3 에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CD2 의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 CD2 의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 CD2 의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2)

내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

7. 제 1항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO, M-CSF이고 이의 수용체는 IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, TNFR, TGFR, IFNR, 인터페론- α R, - β R 및 - γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

8. 제 7 항에 있어서, TNF 와 TNFR 의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) TNF 에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 TNFR 의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 TNFR 의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 TNFR 의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

9. 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역 질환 또는 장기이식 합병증인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

10. 제 9 항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 그레이브스병, 하시모토씨 갑상선염, 애디슨병, 백반증, 경피증, 굿패스처 신드롬, 베제트병, 크론병, 강직성 척추염, 포도막염, 혈소판 감소성 자반증, 심상성 천포창, 소아 당뇨병, 자가면역성 용혈성 빈혈,
- 5 크라일로글로불린증, 부신백질이영양증 및 전신성 홍반성 낭창으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 억제학적 조성물.

요약서

본 발명은 MHC(Major Histocompatibility Complex) Class II 분자와
이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의
5 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수
있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로
이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T
림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

FIG. 1

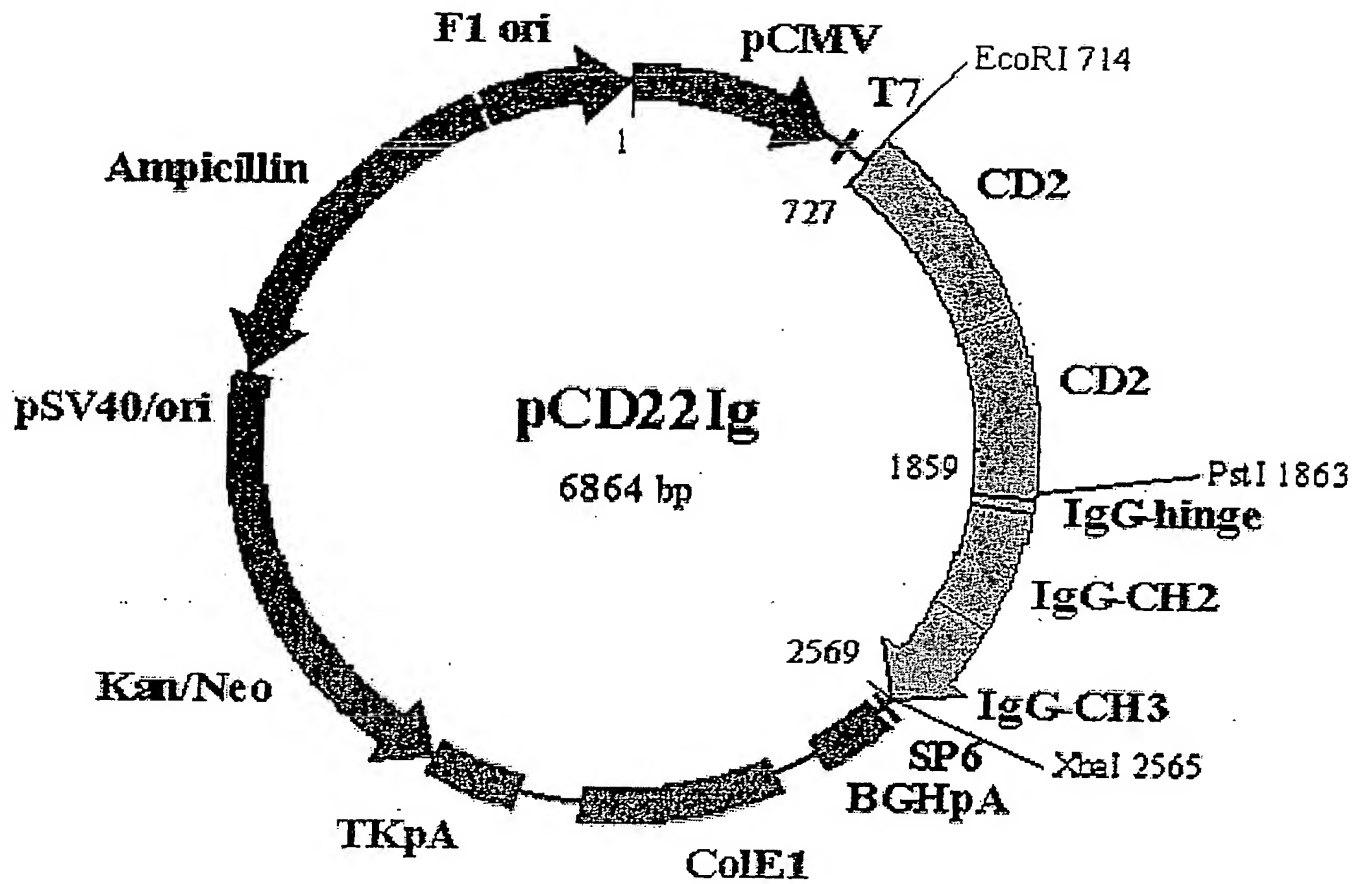


FIG. 2

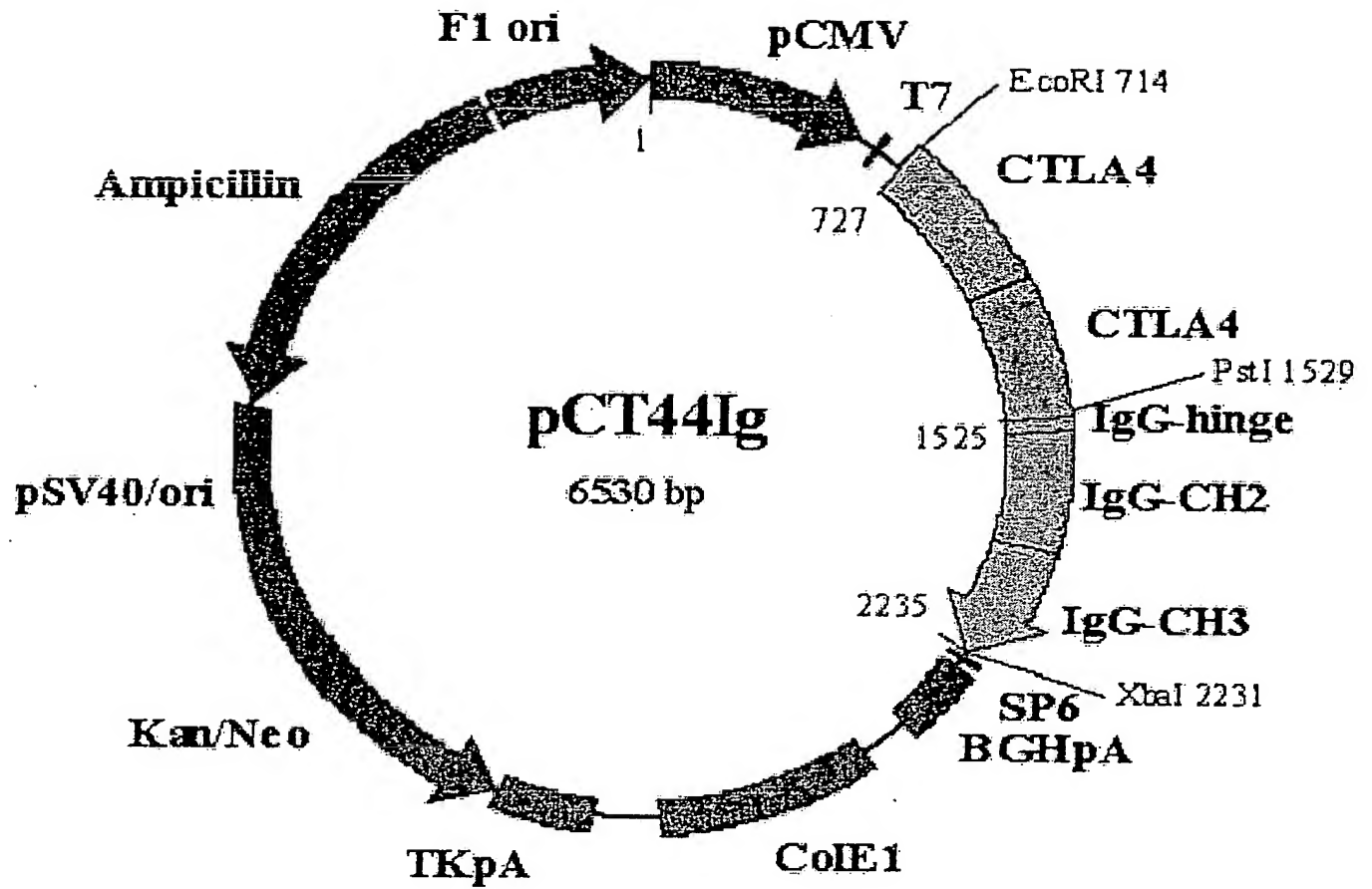


FIG. 3

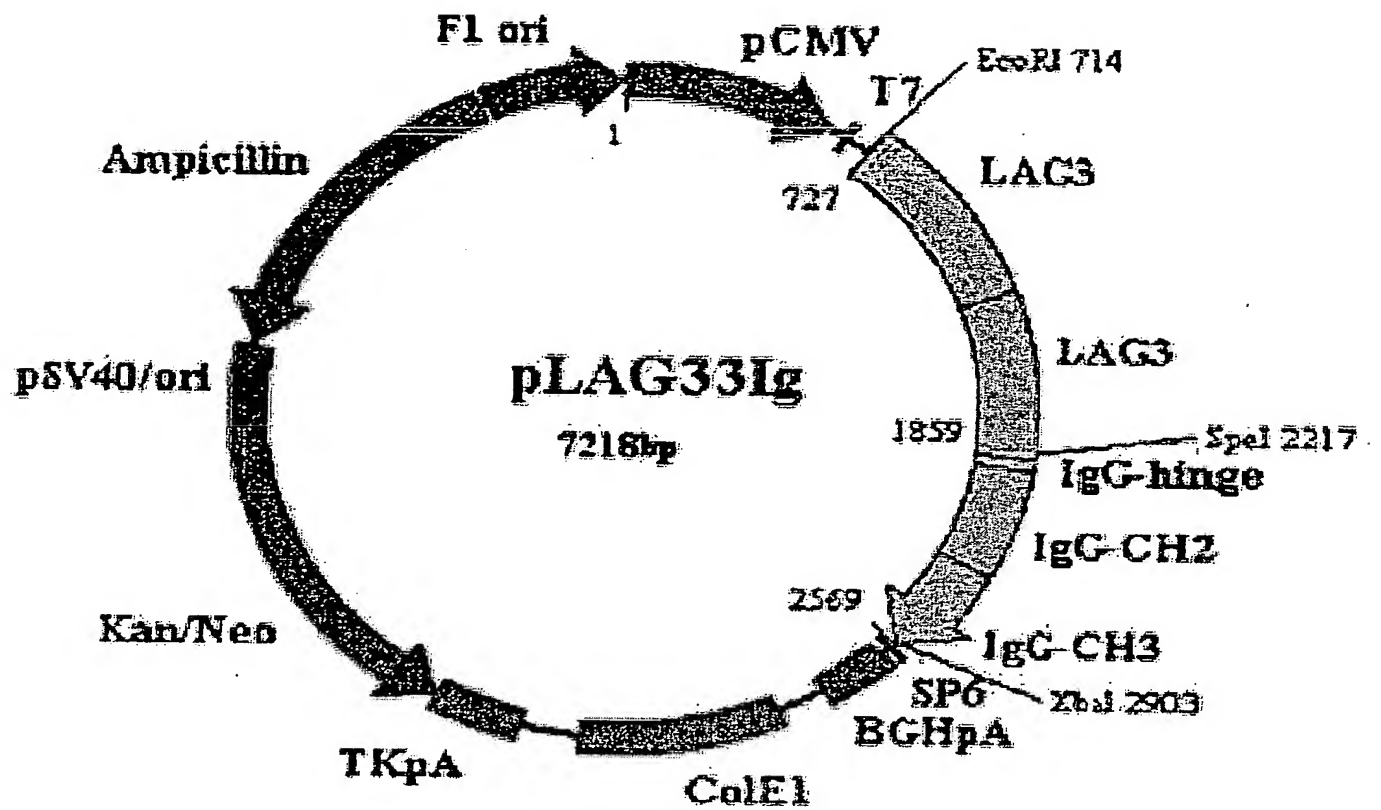
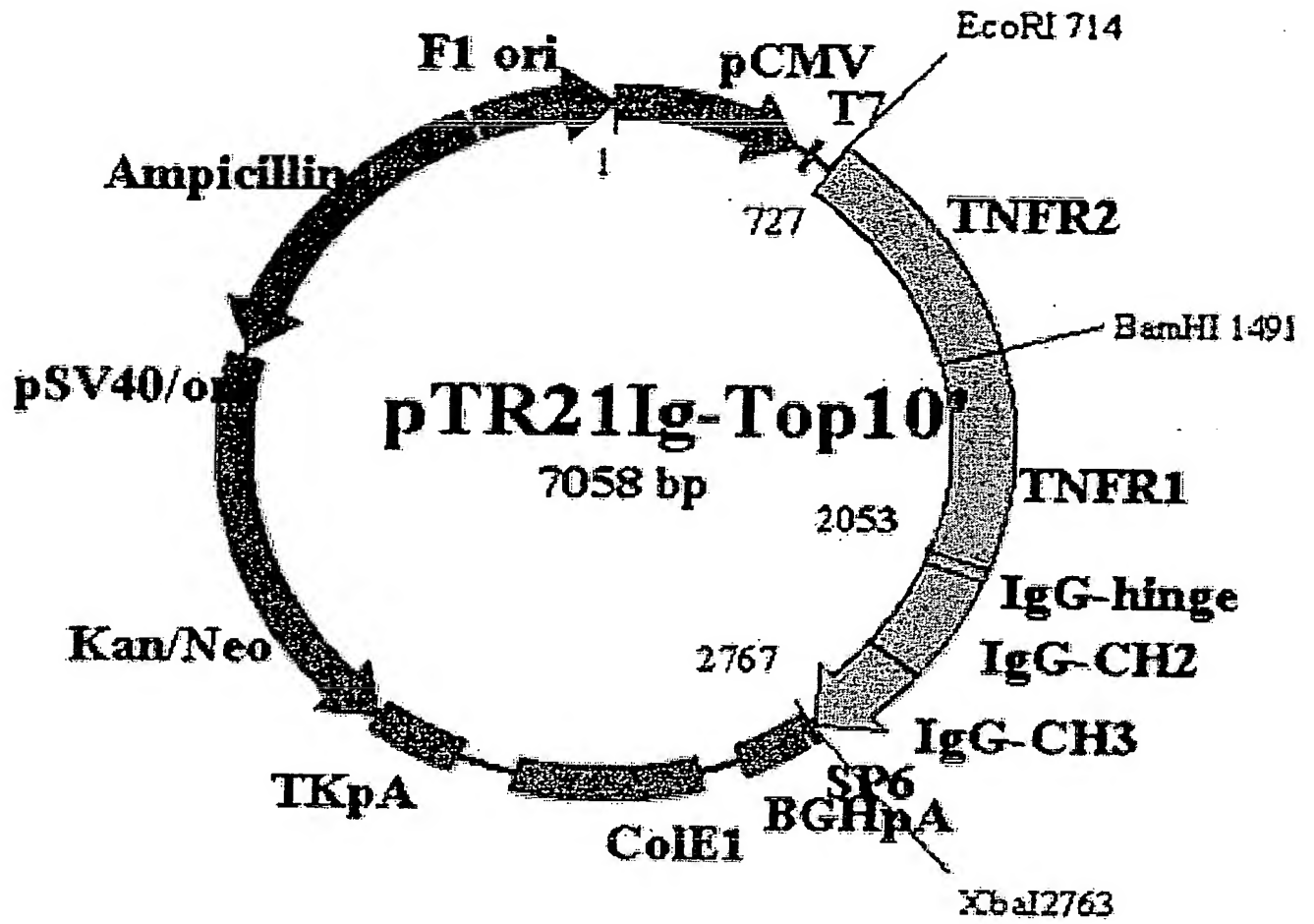
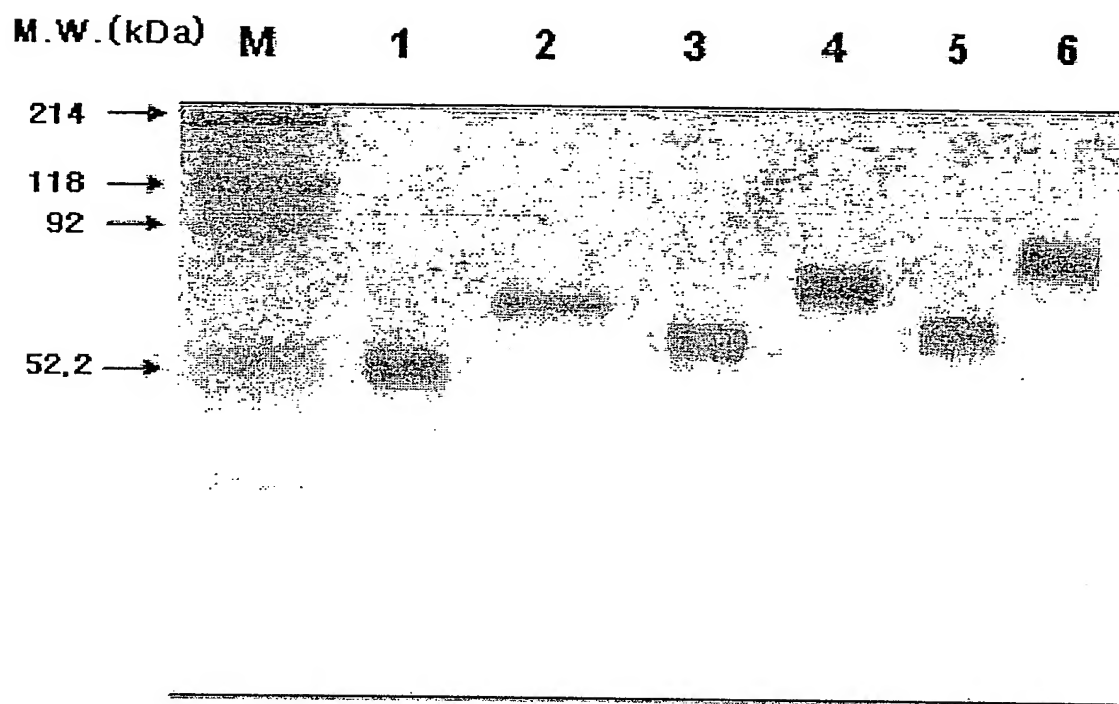


FIG. 4



5/20

FIG. 5a



6/20

FIG. 5b

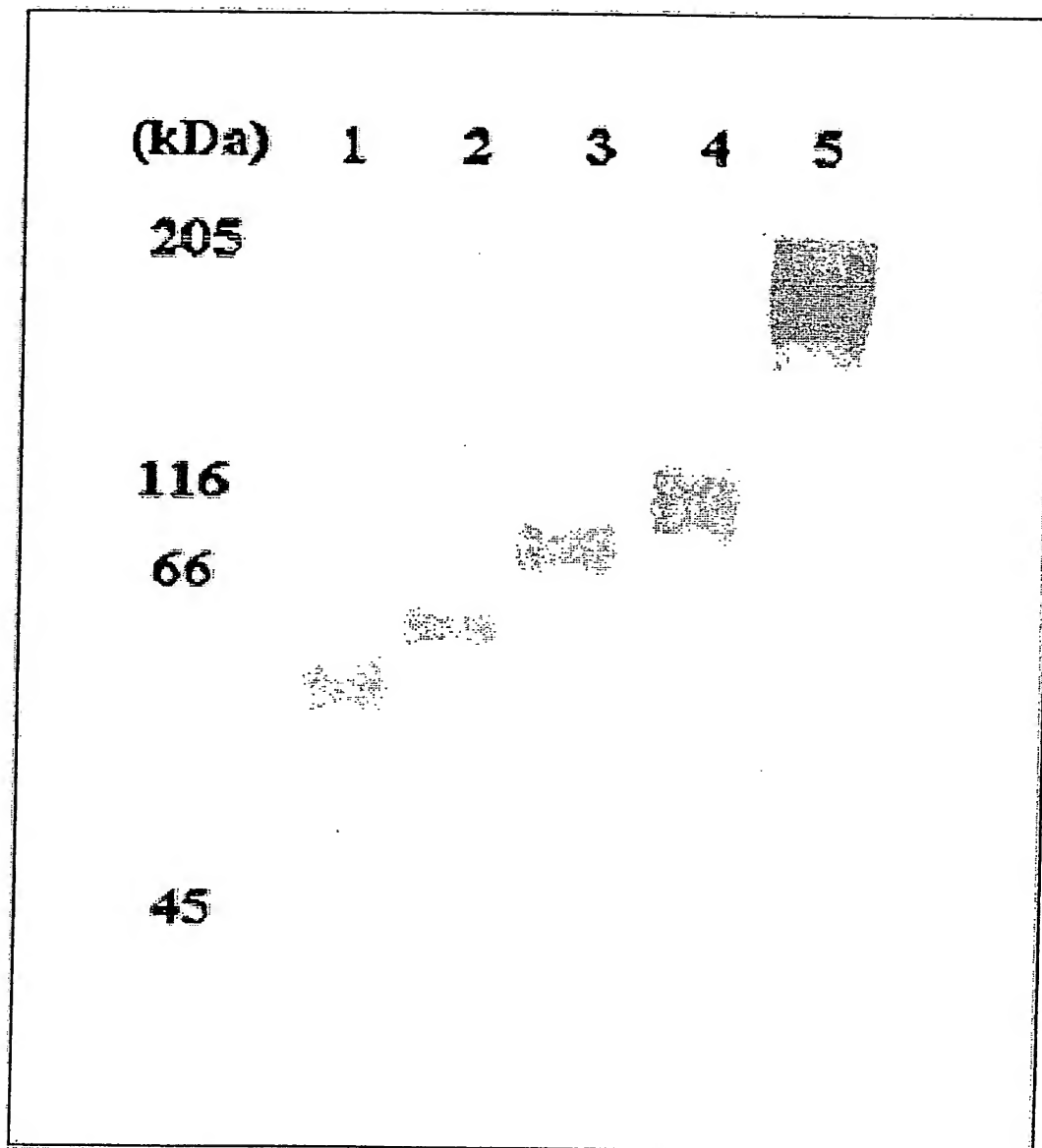


FIG. 6a

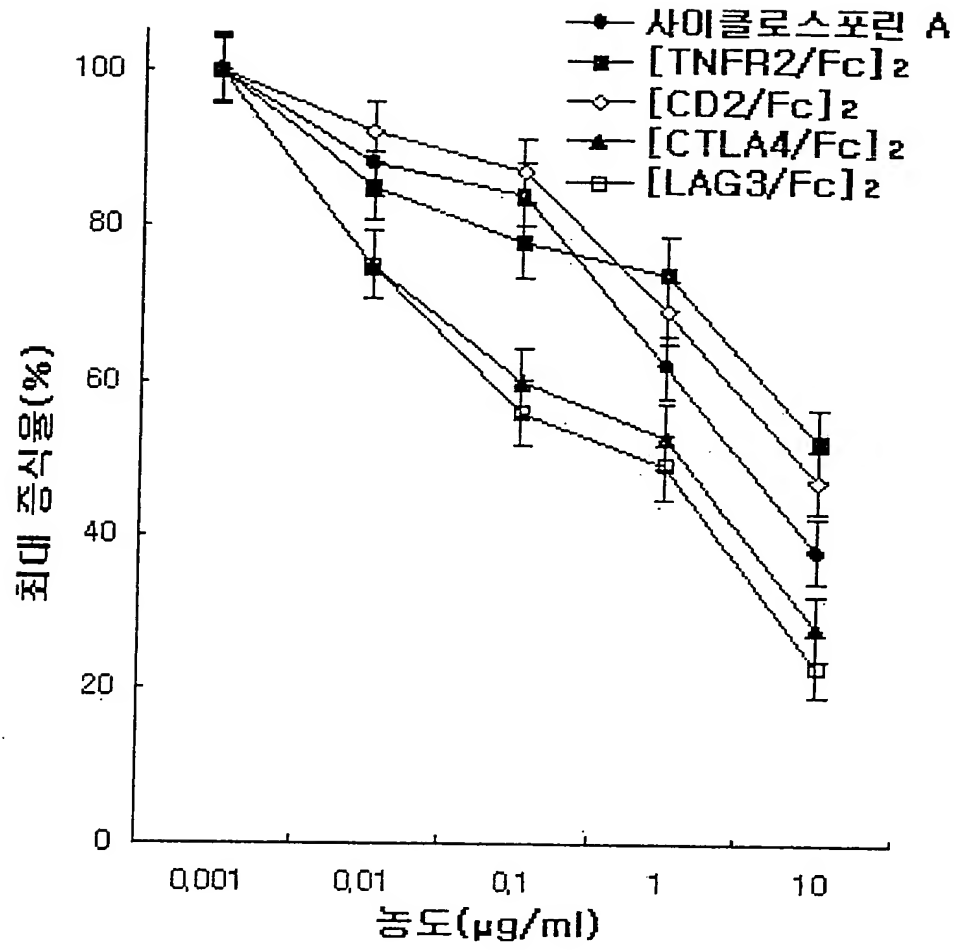


FIG. 6b

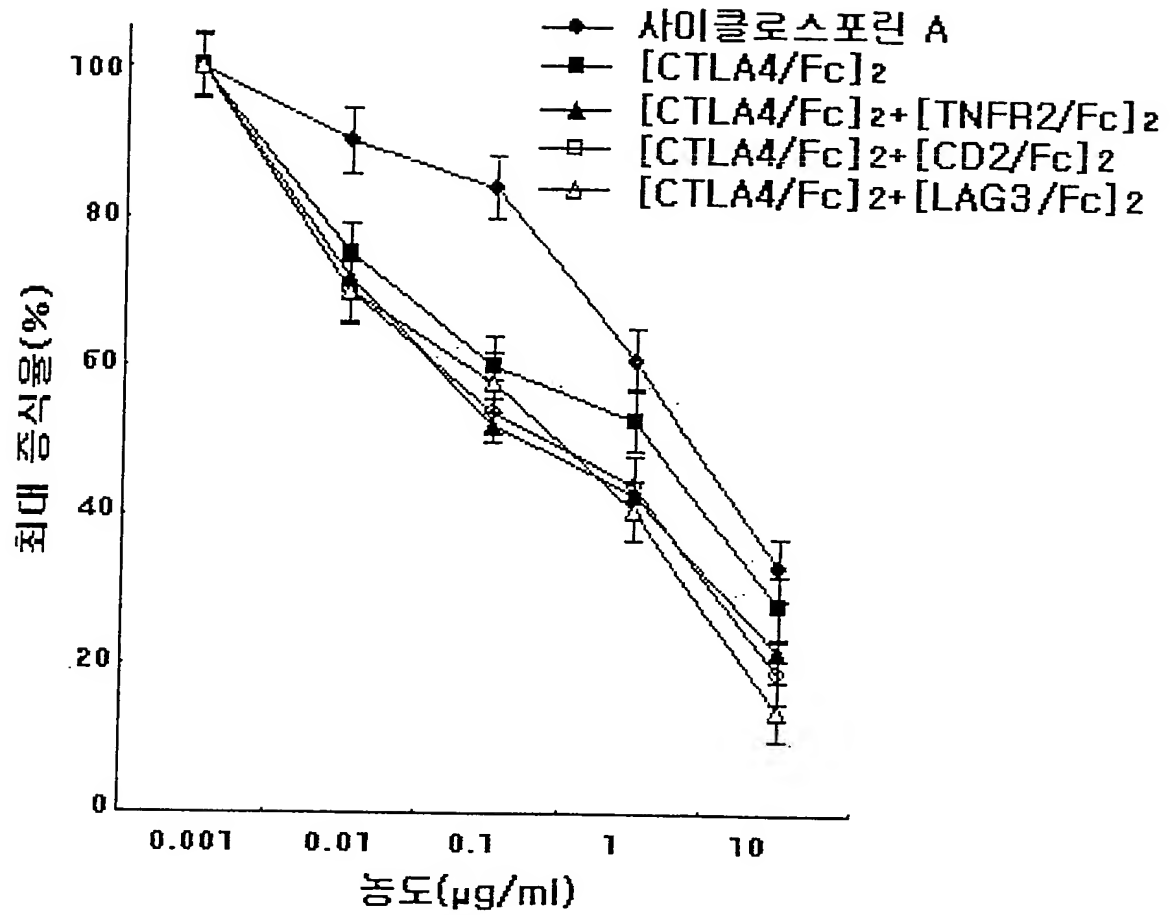
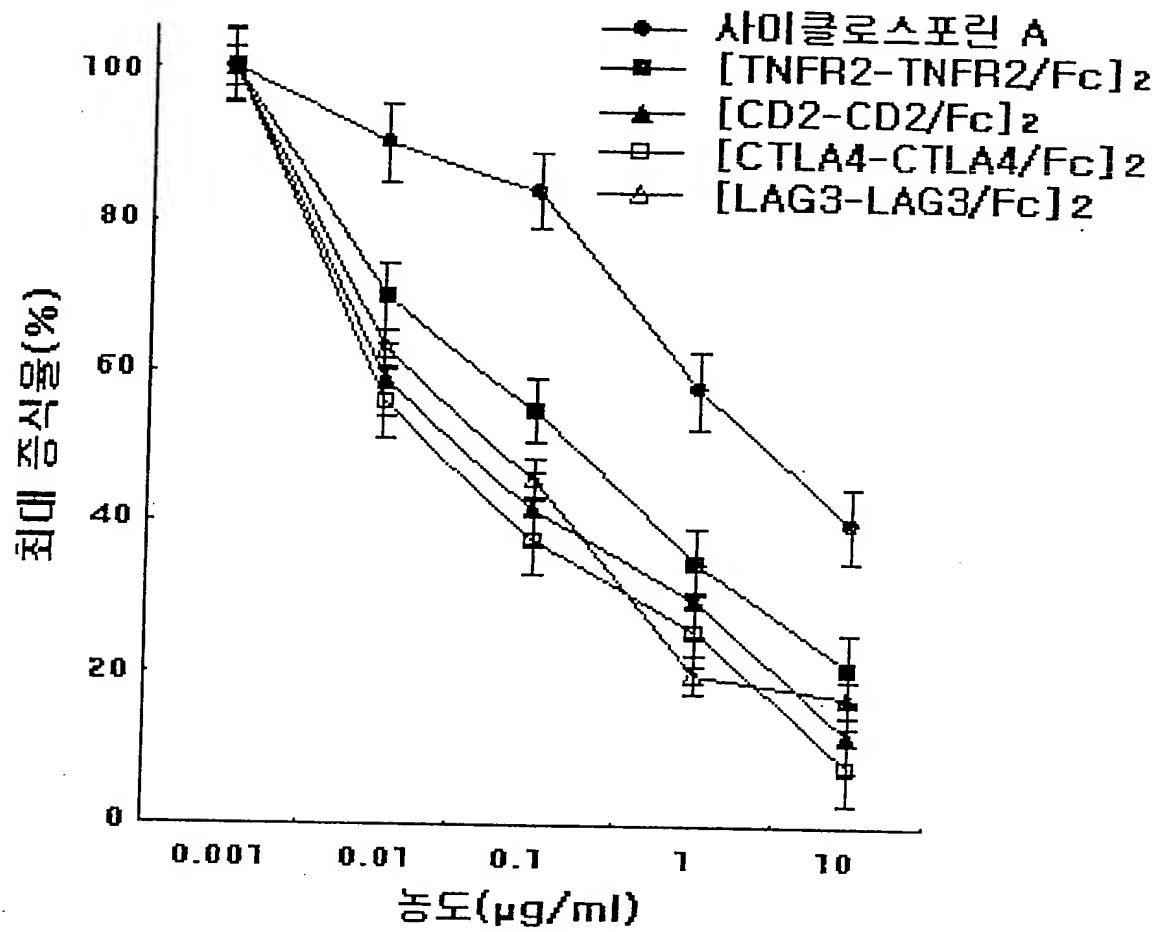
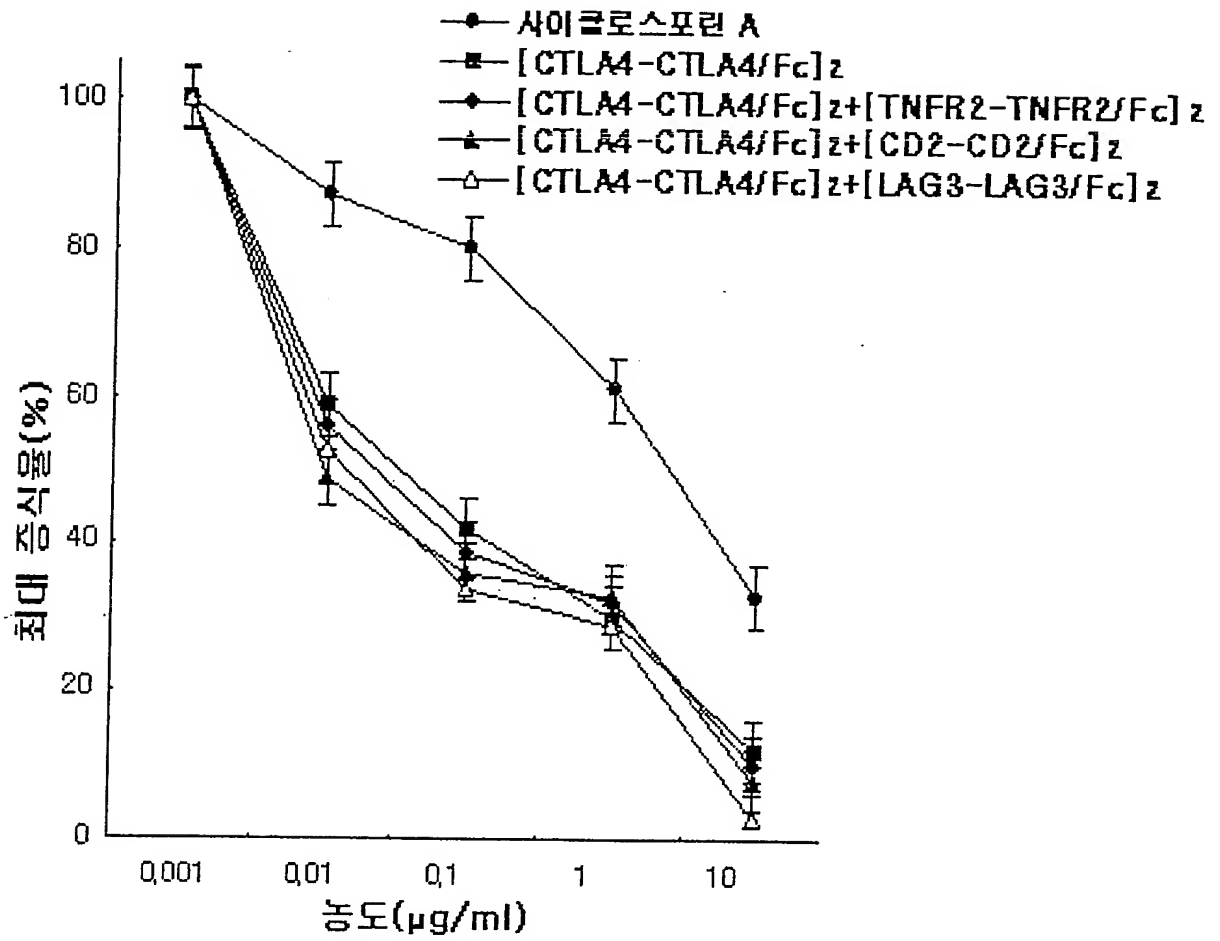


FIG. 6c



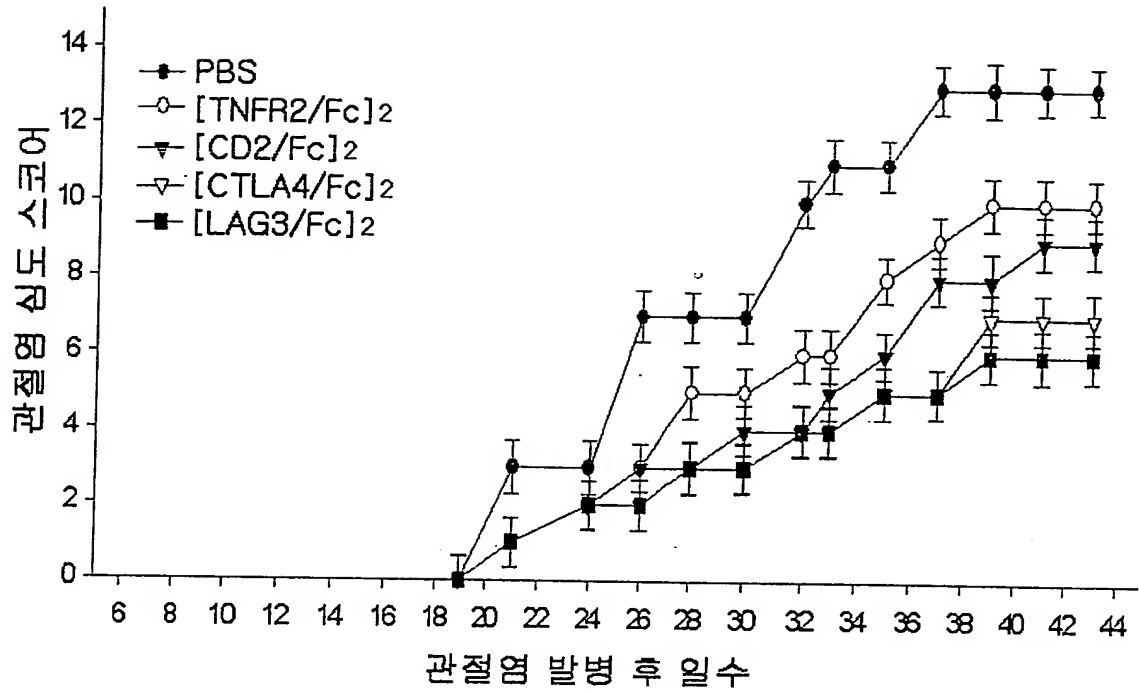
10/20

FIG. 6d



11/20

FIG. 7a



12/20

FIG. 7b

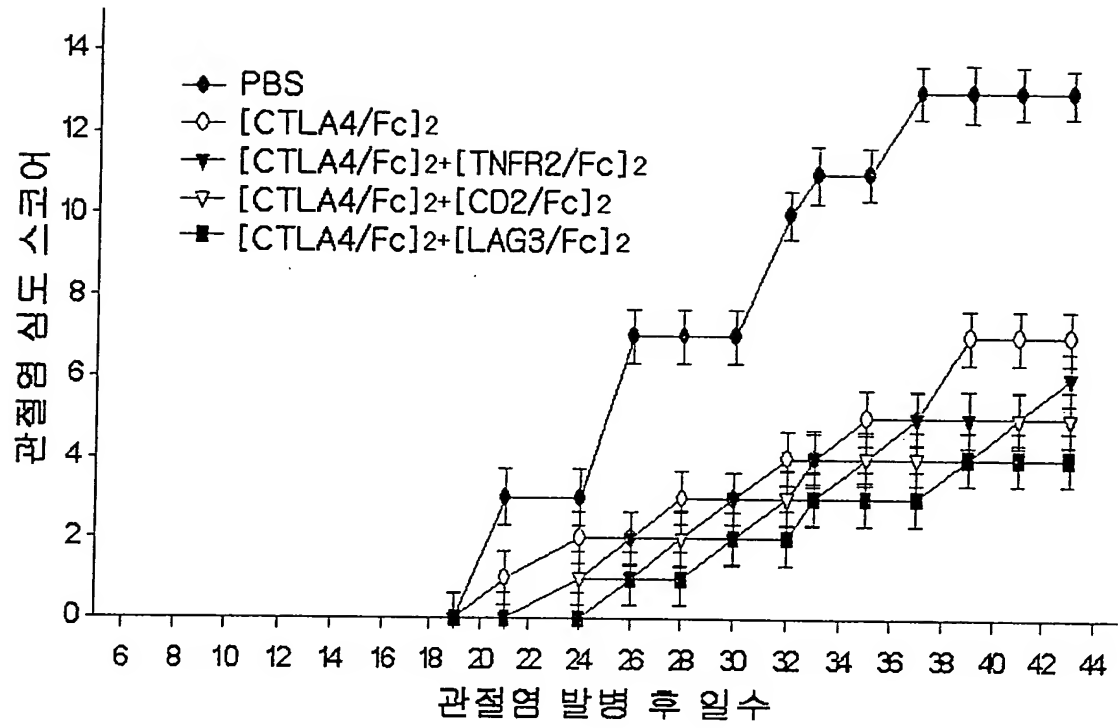


FIG. 7c

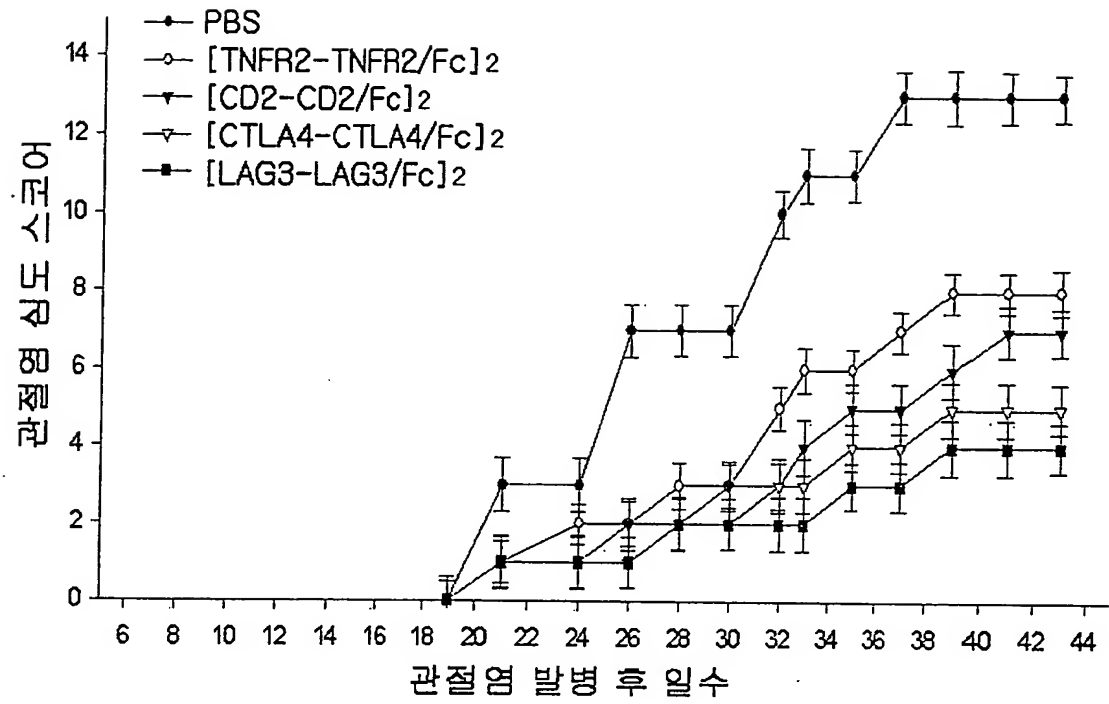


FIG. 7d

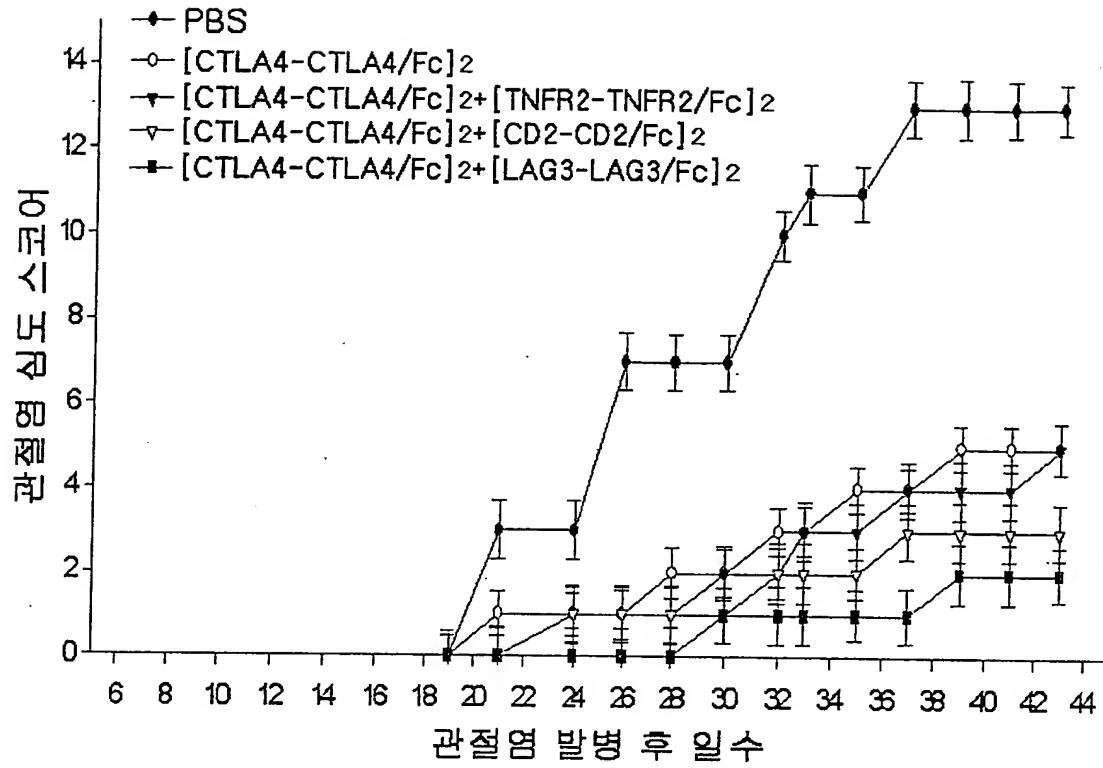


FIG. 8a

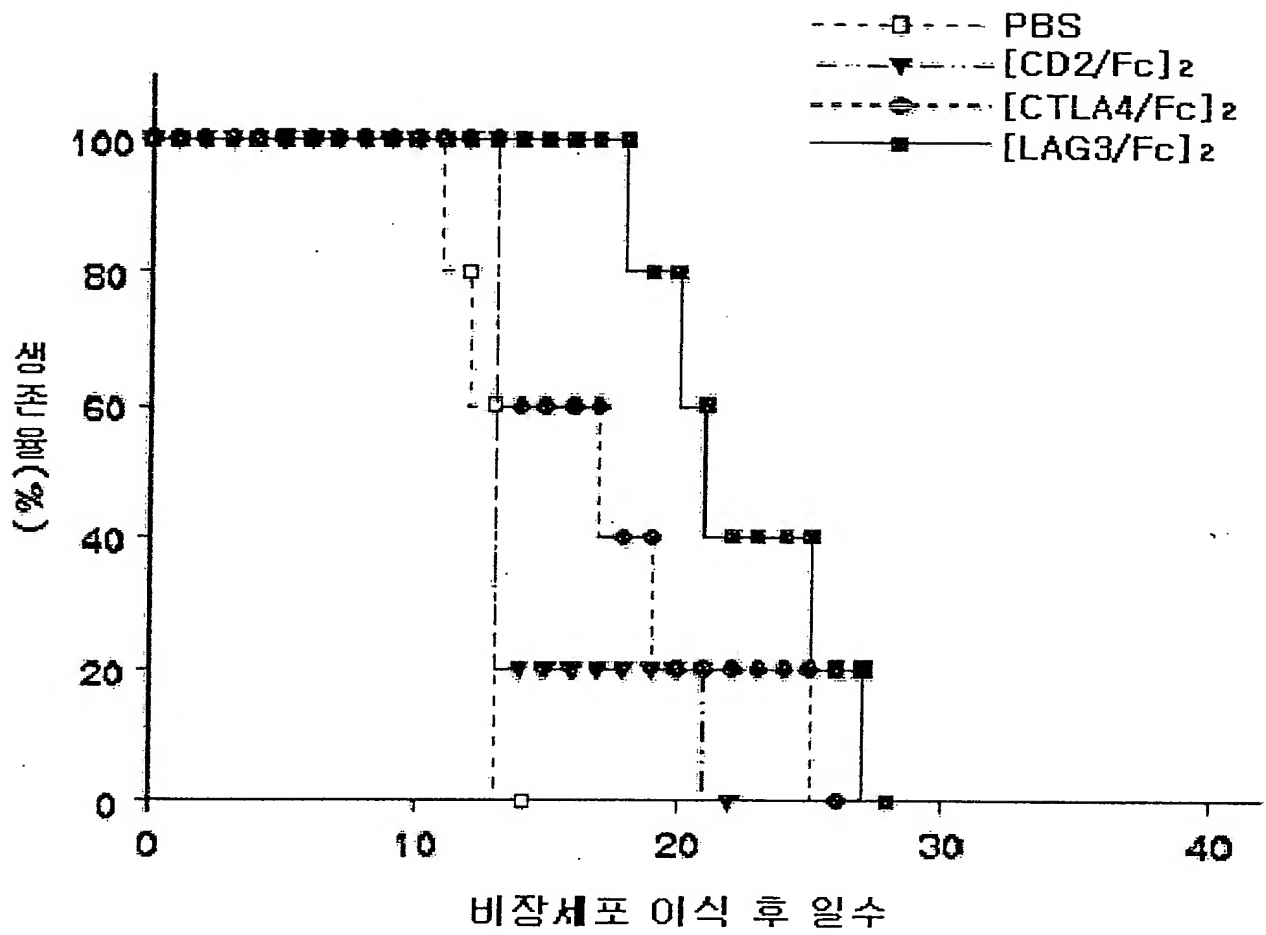


FIG. 8b

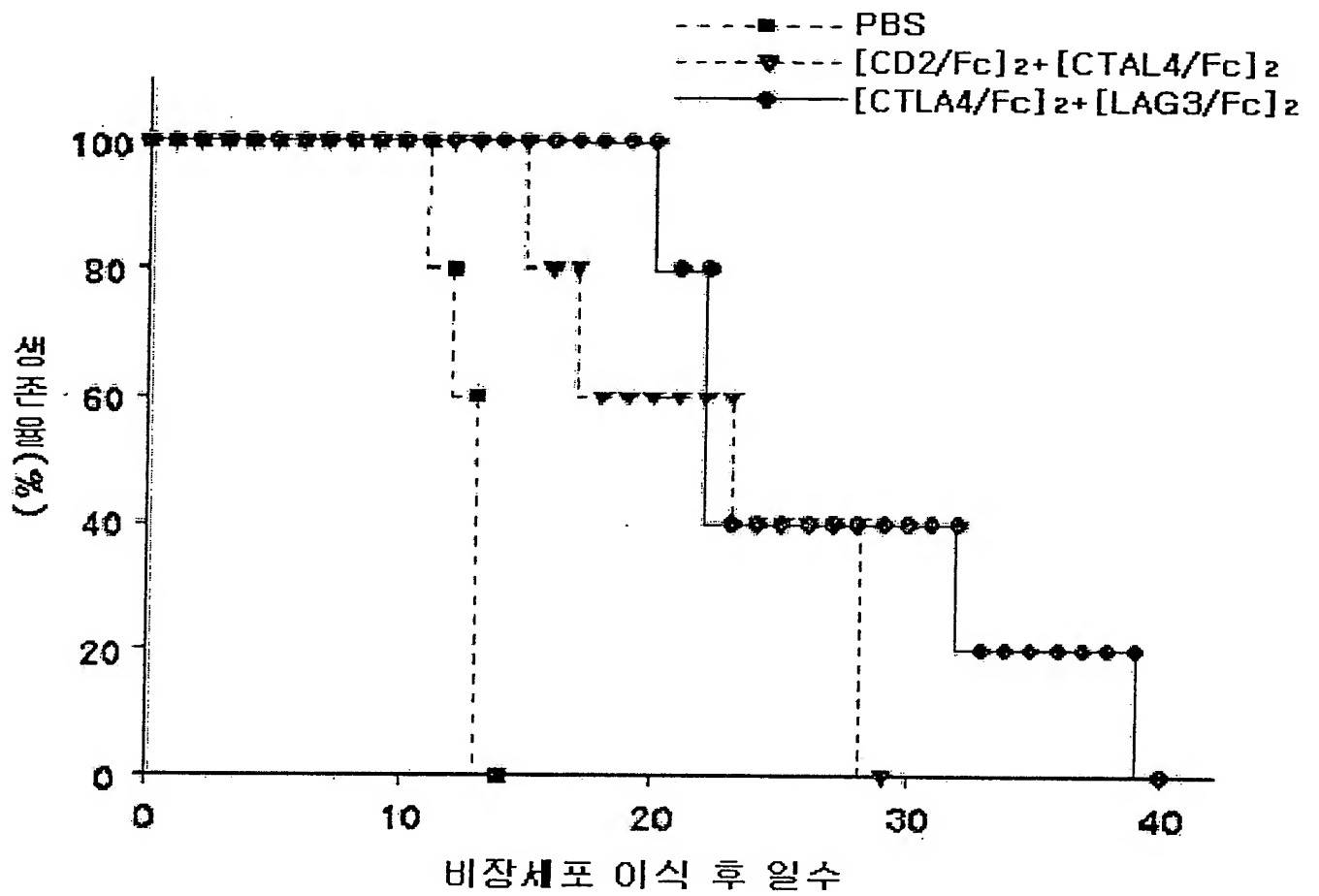


FIG. 8c

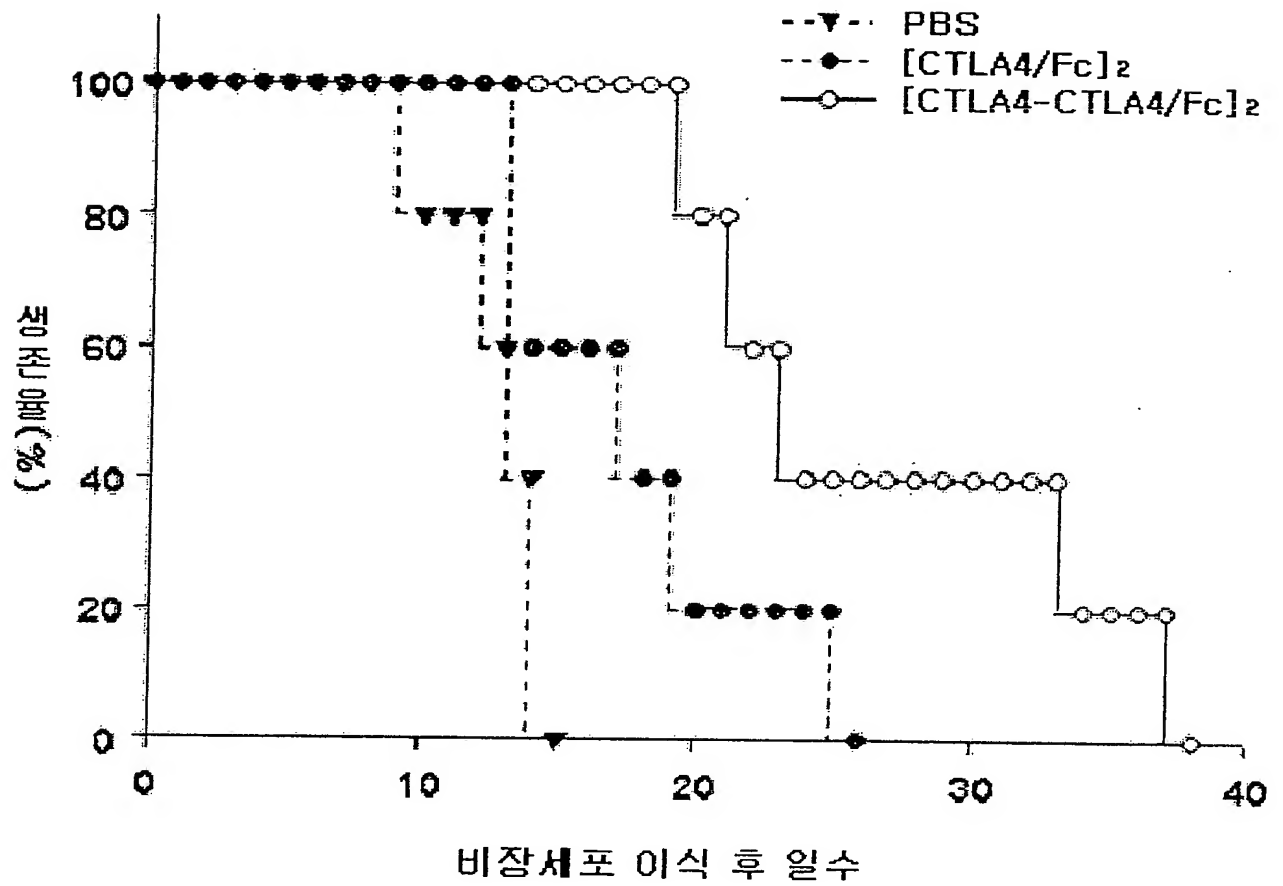


FIG. 8d

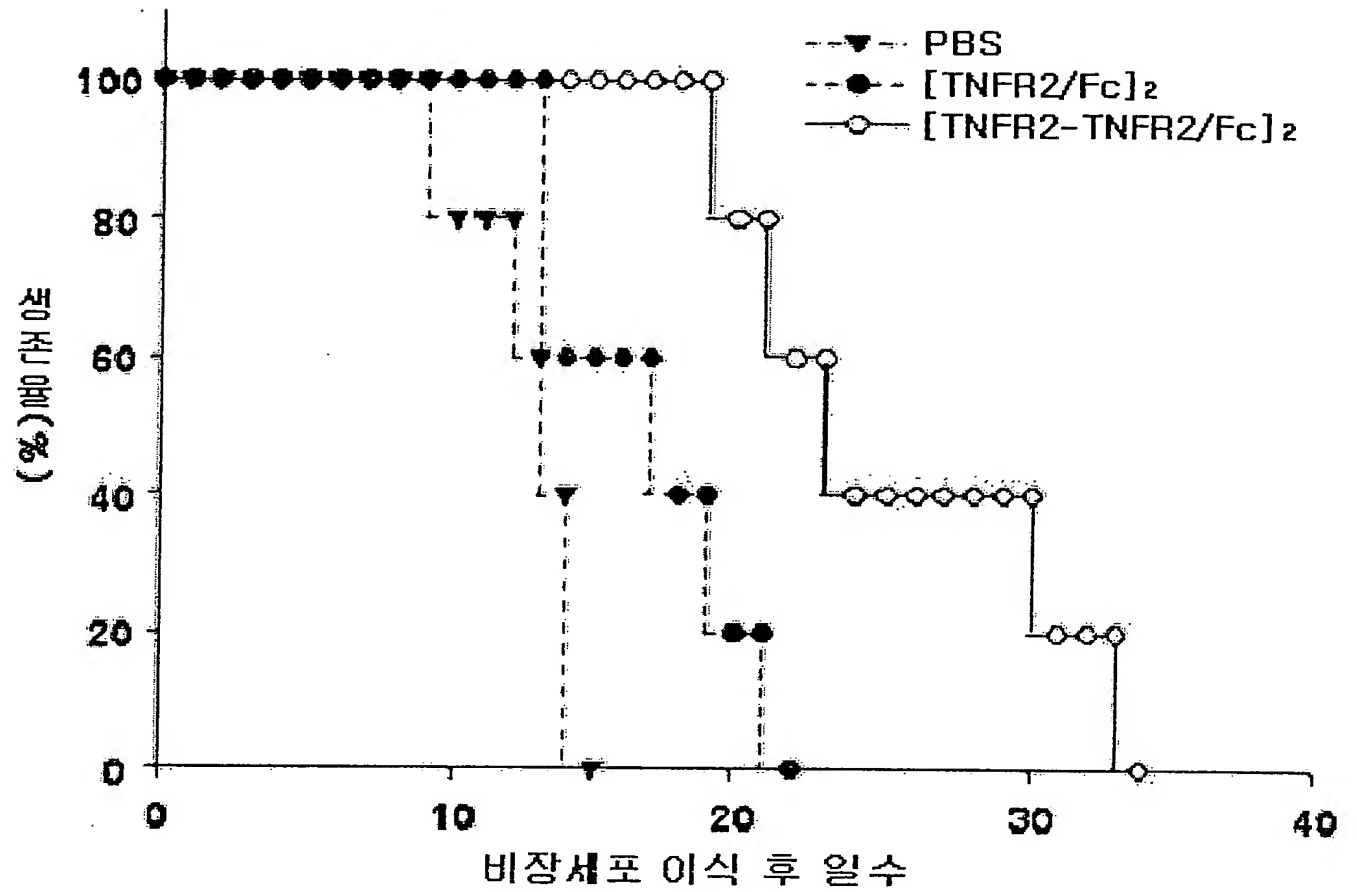


FIG. 8e

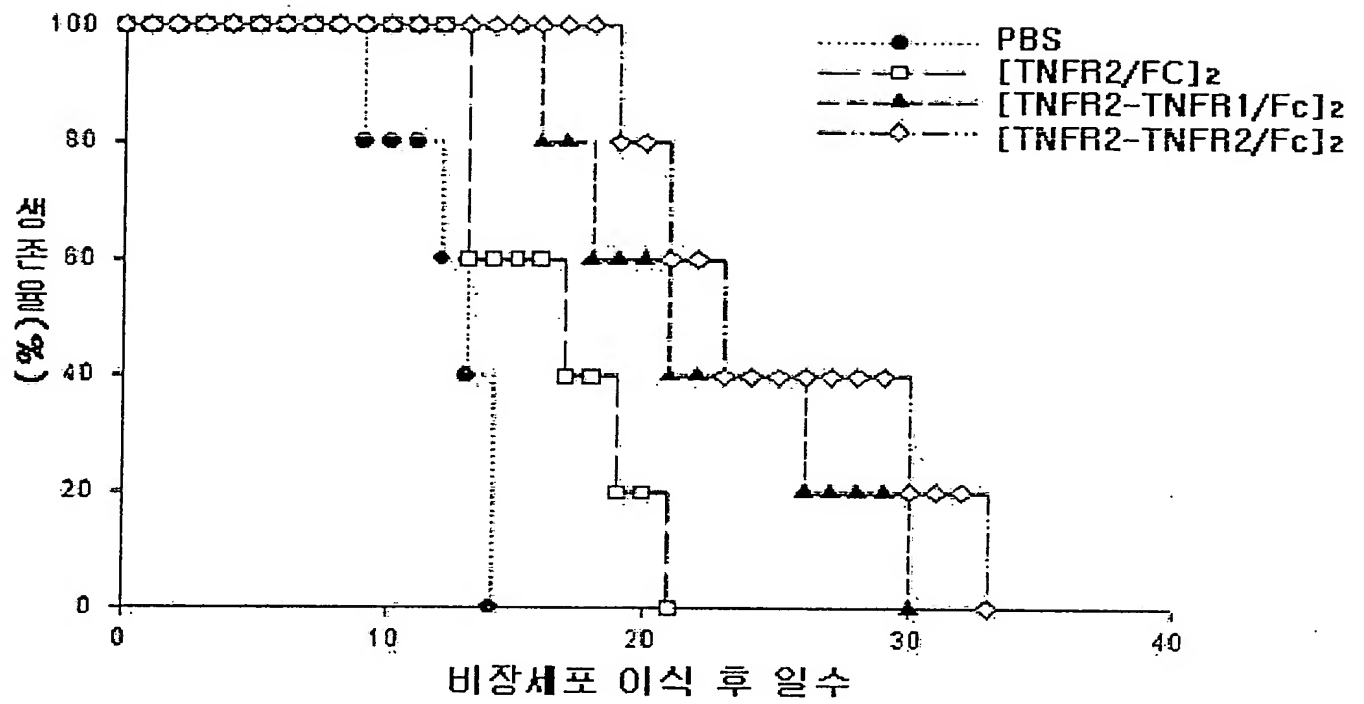
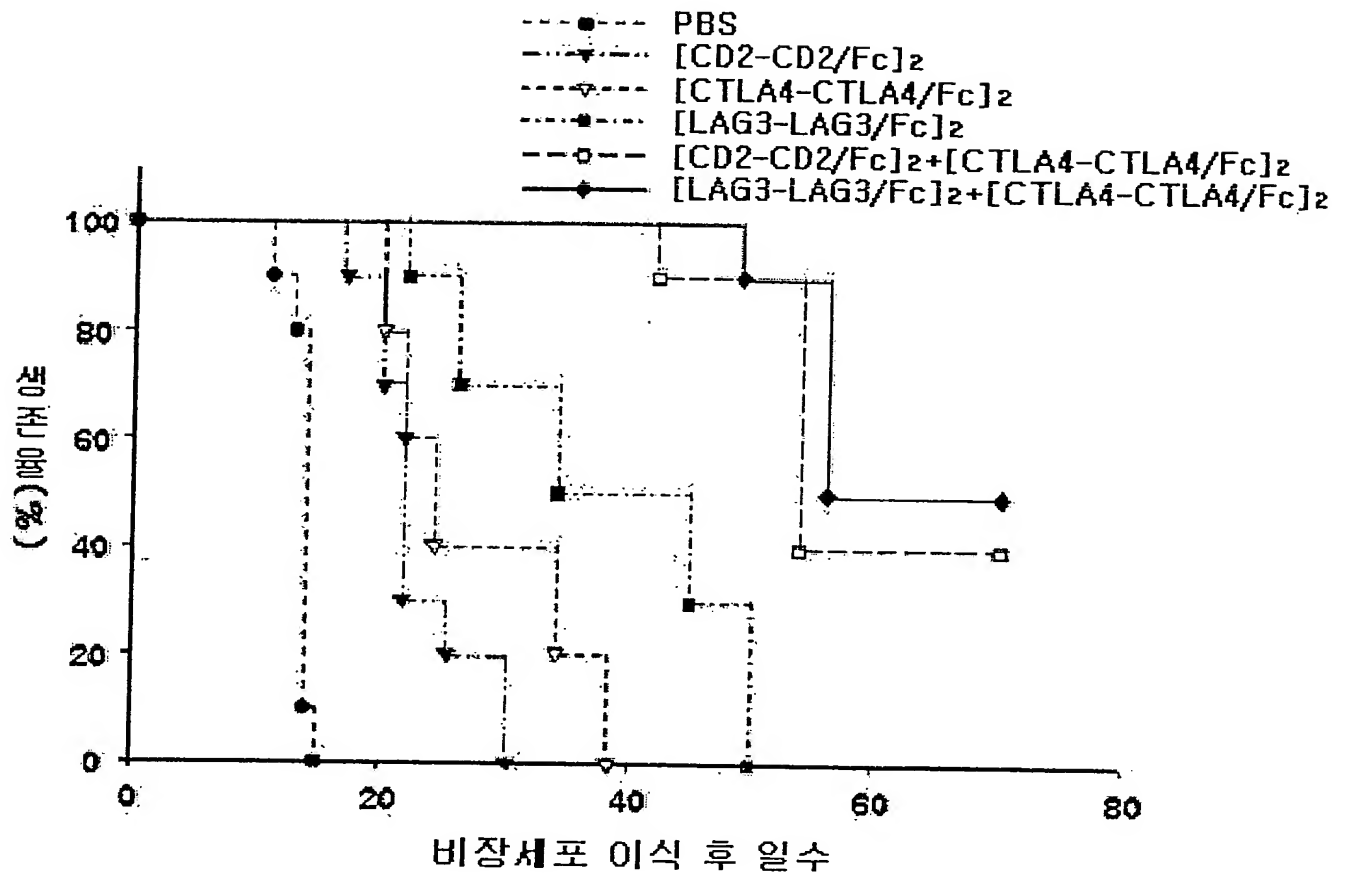


FIG. 8f



Sequence Listing

<110> MEDEXGEN INC
CHUNG, Yong Hoon
CHO, Hoon Sik
PARK, Hong Gyu
YI, Ki Wan

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF IMMUNOLOGICAL
DISORDERS

<130> P052MED02PCT

<150> KR10-2004-0010835
<151> 2004-02-18

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, oligo-LAG3-F-EcoRI

<400> 1
ggaattcatg tgggaggctc agttcctggg c 31

<210> 2
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, oligo-LAG3-R-5P

Sequence Listing

<400> 2

agtgaggtta tacatgatgg agacgttg

28

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer, oligo-LAG3-F-5P

<400> 3

ctccagccag gggctgaggt c

21

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer, oligo-LAG3-R-SpeI

<400> 4

gactagttgg gggctccaga cccagaacag

30

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer, hIgG-F-SpeI

<400> 5

Sequence Listing

gagtagtgca gagcccaaat cttgtgac

28

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 .
 <220>
 <223> primer, hIgG-R-XbaI

<400> 6
 gctctagagc tcatttaccg ggagacaggg agag

34

<210> 7
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1500)
 <223> LAG3/Fc

<400> 7
 atg tgg gag gct cag ttc ctg ggc ttg ctg ttt ctg cag ccg ctt tgg
 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15

48

gtg gct cca gtg aag cct ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg
 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30

96

Sequence Listing

tgg gcc cag gag ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc	144
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile	
35 40 45	
ccc ctc cag gat ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag	192
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln	
50 55 60	
cat cag cca gac agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg	240
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu	
65 70 75 80	
gcc ccc ggc cct cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc	288
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro	
85 90 95	
cgc cgc tac acg gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg	336
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly	
100 105 110	
agg ctg ccc ctg cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag	384
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln	
115 120 125	
cgc ggg gac ttc tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc	432
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala	
130 135 140	
ggc gag tac cgc gcc gcg gtg cac ctc agg gac cgc gcc ctc tcc tgc	480
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys	
145 150 155 160	
cgc ctc cgt ctg cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca	528
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro	
165 170 175	
gga tct ctc aga gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc	576
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser	
180 185 190	

- 5 -

Sequence Listing

<p>tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365</p>	1104
<p>ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 370 375 380</p>	1152
<p>atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400</p>	1200
<p>gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415</p>	1248
<p>agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430</p>	1296
<p>gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445</p>	1344
<p>ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460</p>	1392
<p>gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 480</p>	1440
<p>atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 495</p>	1488
<p>tcc ccg ggt aaa tga Ser Pro Gly Lys 500</p>	1503

Sequence Listing

<210> 8
<211> 500
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175

Sequence Listing

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser
 260 265 270

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

Sequence Listing

385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 9
 <211> 2211
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2208)
 <223> LAG3-LAG3/Fc

<400> 9

Sequence Listing

atg tgg gag gct cag ttc ctg ggc ttg ctg ttt ctg cag ccg ctt tgg	48
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp	
1 5 10 15	
gtg gct cca gtg aag cct ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg	96
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val	
20 25 30	
tgg gcc cag gag ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc	144
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile	
35 40 45	
ccc ctc cag gat ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag	192
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln	
50 55 60	
cat cag cca gac agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg	240
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu	
65 70 75 80	
gcc ccc ggc cct cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc	288
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro	
85 90 95	
cgc cgc tac acg gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg	336
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly	
100 105 110	
agg ctg ccc ctg cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag	384
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln	
115 120 125	
cgc ggg gac ttc tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc	432
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala	
130 135 140	
ggc gag tac cgc gcc gcg gtg cac ctc agg gac cgc gcc ctc tcc tgc	480
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys	
145 150 155 160	

Sequence Listing

cgc ctc cgt ctg cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca	528
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro	
165 170 175	
gga tct ctc aga gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc	576
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser	
180 185 190	
cgc cct gac cgc cca gcc tct gtg cat tgg ttc cgg aac cgg ggc cag	624
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln	
195 200 205	
ggc cga gtc cct gtc cgg gag tcc ccc cat cac cac tta gcg gaa agc	672
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser	
210 215 220	
ttc ctc ttc ctg ccc caa gtc agc ccc atg gac tct ggg ccc tgg ggc	720
Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly	
225 230 235 240	
tgc atc ctc acc tac aga gat ggc ttc aac gtc tcc atc atg tat aac	768
Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn	
245 250 255	
ctc act ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg tgg gcc cag gag	816
Leu Thr Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu	
260 265 270	
ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc ccc ctc cag gat	864
Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp	
275 280 285	
ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag cat cag cca gac	912
Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp	
290 295 300	
agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg gcc ccc ggc cct	960
Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro	
305 310 315 320	

Sequence Listing

cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc cgc cgc tac acg	1008
His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr	
325 330 335	
gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg agg ctg ccc ctg	1056
Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu	
340 345 350	
cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag cgc ggg gac ttc	1104
Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe	
355 360 365	
tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc ggc gag tac cgc	1152
Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg	
370 375 380	
gcc gcg gtg cac ctg agg gac cgc gcc ctg tcc tgc cgc ctg cgt ctg	1200
Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu	
385 390 395 400	
cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca gga tct ctg aga	1248
Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg	
405 410 415	
gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc cgc cct gac cgc	1296
Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg	
420 425 430	
cca gcc tct gtg cat tgg ttc cgg aac cgg ggc cag ggc cga gtc cct	1344
Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro	
435 440 445	
gtc cgg gag tcc ccc cat cac cac tta gcg gaa agc ttc ctg ttc ctg	1392
Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu	
450 455 460	
ccc caa gtc agc ccc atg gac tct ggg ccc tgg ggc tgc atc ctg acc	1440
Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr	
465 470 475 480	

Sequence Listing

tac aga gat ggc ttc aac gtc tcc atc atg tat aac ctc act gtt ctg	1488
Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu	
485 490 495	
ggt ctg gag ccc cca act agt gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act	1536
Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	
500 505 510	
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca	1584
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	
515 520 525	
gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg	1632
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
530 535 540	
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct	1680
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
545 550 555 560	
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc	1728
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
565 570 575	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc	1776
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
580 585 590	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac	1824
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
595 600 605	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc	1872
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
610 615 620	
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg	1920
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
625 630 635 640	

Sequence Listing

```

ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc      1968
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      645              650              655

ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc      2016
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      660              665              670

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac      2064
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
      675              680              685

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc      2112
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      690              695              700

agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct      2160
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      705              710              715              720

ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa      2208
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      725              730              735

tg a      2211

<210> 10
<211> 736
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
  1              5              10              15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
      20              25              30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile

```

Sequence Listing

35	40	45
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln		
50	55	60
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu		
65	70	75
		80
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro		
85	90	95
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly		
100	105	110
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln		
115	120	125
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala		
130	135	140
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys		
145	150	155
		160
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro		
165	170	175
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser		
180	185	190
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln		
195	200	205
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser		
210	215	220
Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
225	230	235
		240
Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
245	250	255

Sequence Listing

Leu Thr Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu
260 265 270

Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp
275 280 285

Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp
290 295 300

Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro
305 310 315 320

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr
325 330 335

Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu
340 345 350

Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe
355 360 365

Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg
370 375 380

Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu
385 390 395 400

Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg
405 410 415

Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg
420 425 430

Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro
435 440 445

Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu
450 455 460

Sequence Listing

```

Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr
465                      470                      475                      480

Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu
                      485                      490                      495

Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
                      500                      505                      510

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
                      515                      520                      525

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                      530                      535                      540

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
545                      550                      555                      560

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
                      565                      570                      575

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
                      580                      585                      590

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
                      595                      600                      605

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                      610                      615                      620

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
625                      630                      635                      640

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                      645                      650                      655

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
                      660                      665                      670

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

```

Sequence Listing

675

680

685

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
690 695 700

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
705 710 715 720

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
725 730 735

<210> 11
<211> 1473
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1470)
<223> TNFR2/Fc

<400> 11
atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15
tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30
gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45
aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys

Sequence Listing

50	55	60	
gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac			240
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp			
65	70	75	80
agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt			288
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys			
85	90	95	
ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg			336
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg			
100	105	110	
gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc ggc tgg tac tgc gcg ctg			384
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu			
115	120	125	
agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc			432
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg			
130	135	140	
ccg ggc ttc ggc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg			480
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val			
145	150	155	160
tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg			528
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr			
165	170	175	
gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg			576
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly			
180	185	190	
aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt			624
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser			
195	200	205	
atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc			672
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser			

Sequence Listing

210	215	220	
caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc			720
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser			
225	230	235	240
ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc act ggc			768
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly			
	245	250	255
gac gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc			816
Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	260	265	270
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca			864
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	275	280	285
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc			912
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	290	295	300
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg			960
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
305	310	315	320
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag			1008
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	325	330	335
gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg			1056
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	340	345	350
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac			1104
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	355	360	365
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg			1152
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			

Sequence Listing

370	375	380	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag			1200
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
385	390	395	400
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat			1248
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
405	410	415	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac			1296
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
420	425	430	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tcc ttc			1344
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe			
435	440	445	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac			1392
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
450	455	460	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg			1440
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
465	470	475	480
cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga			1473
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
485	490		
<210> 12			
<211> 490			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 12			
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu			
1	5	10	15

Sequence Listing

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser

Sequence Listing

225	230	235	240
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly			
245	250	255	
Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
260	265	270	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
275	280	285	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
290	295	300	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
305	310	315	320
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
325	330	335	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
340	345	350	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
355	360	365	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
370	375	380	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
385	390	395	400
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
405	410	415	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
420	425	430	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe			
435	440	445	

Sequence Listing

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 450 455 460

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 465 470 475 480

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 13
 <211> 2163
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2160)
 <223> TNFR2-TNFR2/Fc

<400> 13
 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60
 gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac 240

- 25 -

- 26 -

Sequence Listing

Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser			
385	390	395	400
aac acg act tca tcc acg gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac			1248
Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn			
	405	410	415
gtg gtg gcc atc cct ggg aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc			1296
Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser			
	420	425	430
acg tcc ccc acc cgg agt atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag			1344
Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln			
	435	440	445
cca gtg tcc aca cga tcc caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc			1392
Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser			
	450	455	460
act gct cca agc acc tcc ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca			1440
Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro			
465	470	475	480
gct gaa ggg agc act ggc gac gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act			1488
Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	485	490	495
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca			1536
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	500	505	510
gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg			1584
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	515	520	525
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct			1632
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
	530	535	540
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc			1680

- 28 -

tga	2163
-----	------

```
<400> 14
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
  1             5             10            15
```

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

- 29 -

Sequence Listing

145	150	155	160
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr			
165	170	175	
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly			
180	185	190	
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser			
195	200	205	
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser			
210	215	220	
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser			
225	230	235	240
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser			
245	250	255	
Asn Ala Thr Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu			
260	265	270	
Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser			
275	280	285	
Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val			
290	295	300	
Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val			
305	310	315	320
Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu			
325	330	335	
Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro			
340	345	350	
Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala			
355	360	365	

Sequence Listing

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr
370 375 380

Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser
385 390 395 400

Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn
405 410 415

Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser
420 425 430

Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln
435 440 445

Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser
450 455 460

Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro
465 470 475 480

Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
485 490 495

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
500 505 510

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
515 520 525

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
530 535 540

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
545 550 555 560

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
565 570 575

Sequence Listing

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 580 585 590

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 595 600 605

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 610 615 620

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 625 630 635 640

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 645 650 655

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 660 665 670

Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 675 680 685

Arg Trp Gln-Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 690 695 700

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 705 710 715 720

<210> 15
 <211> 1314
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1311)
 <223> CD2/Fc

<400> 15

Sequence Listing

atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta gcc agc ttc ctt ctg att ttc aat	48
Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn	
1 5 10 15	
gtt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa	96
Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu	
20 25 30	
acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att cct agt ttt	144
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe	
35 40 45	
caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac	192
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp	
50 55 60	
aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa	240
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu	
65 70 75 80	
aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat	288
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His	
85 90 95	
ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca	336
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr	
100 105 110	
aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag	384
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu	
115 120 125	
agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg	432
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu	
130 135 140	
acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa	480
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln	
145 150 155 160	

Sequence Listing

gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg	528
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp	
165 170 175	
acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc	576
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val	
180 185 190	
agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct gca gag ccc aaa	624
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Ala Glu Pro Lys	
195 200 205	
tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc	672
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	
210 215 220	
ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc	720
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
225 230 235 240	
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg	768
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
245 250 255	
agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg	816
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
260 265 270	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc	864
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	
275 280 285	
acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg	912
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
290 295 300	
aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc	960
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	
305 310 315 320	

Sequence Listing

<p>ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 325 330 335</p>	1008
<p>cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 340 345 350</p>	1056
<p>gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 355 360 365</p>	1104
<p>gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 370 375 380</p>	1152
<p>cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 385 390 395 400</p>	1200
<p>acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 405 410 415</p>	1248
<p>gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 420 425 430</p>	1296
<p>ctg tct ccg ggt aaa tga Leu Ser Pro Gly Lys 435</p>	1314
<p><210> 16 <211> 437 <212> PRT <213> Homo sapiens</p>	
<p><400> 16 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn</p>	

Sequence Listing

1	5	10	15
Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu			
20	25	30	
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe			
35	40	45	
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp			
50	55	60	
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu			
65	70	75	80
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His			
85	90	95	
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr			
100	105	110	
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu			
115	120	125	
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu			
130	135	140	
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln			
145	150	155	160
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp			
165	170	175	
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val			
180	185	190	
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Ala Glu Pro Lys			
195	200	205	
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
210	215	220	

Sequence Listing

```

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
225                230                235                240

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                245                250                255

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
                260                265                270

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                275                280                285

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                290                295                300

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
305                310                315                320

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                325                330                335

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
                340                345                350

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                355                360                365

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                370                375                380

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
385                390                395                400

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                405                410                415

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
                420                425                430

```


Sequence Listing

Leu Ser Pro Gly Lys

435

<210> 17
 <211> 1854
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1851)
 <223> CD2-CD2/Fc

<400> 17
 atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta gcc agc ttc ctt ctg att ttc aat 48
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 gtt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa 96
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30
 acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att cct agt ttt 144
 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45
 caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac 192
 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60
 aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa 240
 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80
 aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat 288
 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95

Sequence Listing

ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr 100 105 110	336
aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu 115 120 125	384
agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu 130 135 140	432
acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln 145 150 155 160	480
gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp 165 170 175	528
acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val 180 185 190	576
agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct aaa gag att acg Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Lys Glu Ile Thr 195 200 205	624
aat gcc ttg gaa acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp 210 215 220	672
att cct agt ttt caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu 225 230 235 240	720
aaa act tca gac aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Lys Glu Lys Glu 245 250 255	768

Sequence Listing

act ttc aag gaa aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg	816
Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu	
260 265 270	
aaa att aag cat ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca	864
Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser	
275 280 285	
ata tat gat aca aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg	912
Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu	
290 295 300	
aag att caa gag agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc	960
Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile	
305 310 315 320	
aac aca acc ctg acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta	1008
Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu	
325 330 335	
aac ctg tat caa gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc	1056
Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile	
340 345 350	
aca cac aag tgg acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca	1104
Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala	
355 360 365	
ggg aac aaa gtc agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct	1152
Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro	
370 375 380	
gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca	1200
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
385 390 395 400	
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa	1248
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
405 410 415	

Sequence Listing

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 420 425 430	1296
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 435 440 445	1344
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 450 455 460	1392
cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His 465 470 475 480	1440
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 485 490 495	1488
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 500 505 510	1536
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 515 520 525	1584
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 530 535 540	1632
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 545 550 555 560	1680
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 565 570 575	1728

Sequence Listing

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1776
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 580 585 590

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1824
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1854
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 18
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45

Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60

Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95

Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110

Sequence Listing

Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
115 120 125

Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
130 135 140

Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
145 150 155 160

Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
165 170 175

Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
180 185 190

Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Lys Glu Ile Thr
195 200 205

Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp
210 215 220

Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu
225 230 235 240

Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu
245 250 255

Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu
260 265 270

Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser
275 280 285

Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu
290 295 300

Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile
305 310 315 320

Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu

Sequence Listing

325	330	335
Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile		
340	345	350
Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala		
355	360	365
Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro		
370	375	380
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
385	390	395 400
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
405	410	415
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
420	425	430
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
435	440	445
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
450	455	460
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His		
465	470	475 480
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
485	490	495
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
500	505	510
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu		
515	520	525
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
530	535	540

Sequence Listing

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 545 550 555 560

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 565 570 575

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 580 585 590

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 19
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1131)
 <223> CTLA4/Fc

<400> 19
 atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ctt ctc ttc atc cct 48
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30
 agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc 144
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45

Sequence Listing

aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag	192
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln	
50 55 60	
gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc	240
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr	
65 70 75 80	
ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg	288
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val	
85 90 95	
aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc	336
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile	
100 105 110	
tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc	384
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly	
115 120 125	
aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tct	432
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser	
130 135 140	
gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca	480
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
145 150 155 160	
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa	528
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
165 170 175	
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg	576
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
180 185 190	
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac	624
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
195 200 205	

Sequence Listing

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag	672
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
210 215 220	
cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac	720
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
225 230 235 240	
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa	768
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
245 250 255	
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag	816
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
260 265 270	
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg	864
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
275 280 285	
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc	912
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
290 295 300	
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac	960
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
305 310 315 320	
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc	1008
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
325 330 335	
tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc	1056
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
340 345 350	
ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag	1104
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
355 360 365	

Sequence Listing

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1134
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 20
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
1 5 10 15
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
20 25 30
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
50 55 60
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
65 70 75 80
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
85 90 95
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
100 105 110
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
115 120 125
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
130 135 140
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

Sequence Listing

145	150	155	160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
165	170	175	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
180	185	190	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
195	200	205	
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
210	215	220	
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
225	230	235	240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
245	250	255	
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
260	265	270	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
275	280	285	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
290	295	300	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
305	310	315	320
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
325	330	335	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
340	345	350	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
355	360	365	

Sequence Listing

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 21
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1506)
 <223> CTLA4-CTLA4/Fc

<400> 21
 atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ctt ctc ttc atc cct 48
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30
 agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc 144
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45
 aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag 192
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60
 gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc 240
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80
 ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg 288
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95

Sequence Listing

<p>aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile 100 105 110</p>	336
<p>tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly 115 120 125</p>	384
<p>aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tcg Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser 130 135 140</p>	432
<p>gat aac atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga Asp Asn Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg 145 150 155 160</p>	480
<p>ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr 165 170 175</p>	528
<p>gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu 180 185 190</p>	576
<p>gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp 195 200 205</p>	624
<p>gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr 210 215 220</p>	672
<p>atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val 225 230 235 240</p>	720
<p>gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr 245 250 255</p>	768

Sequence Listing

cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tct gca gag ccc Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro 260 265 270	816
aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 275 280 285	864
ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 290 295 300	912
acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 305 310 315 320	960
gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 325 330 335	1008
gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag tac aac Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 340 345 350	1056
agc acg tac ccg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac cag gac tgg Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp 355 360 365	1104
ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 370 375 380	1152
gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 385 390 395 400	1200
cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn 405 410 415	1248

Sequence Listing

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc 1296
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 1344
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1392
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1440
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1488
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1509
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 22
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45

Sequence Listing

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
50 55 60

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
65 70 75 80

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
85 90 95

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
100 105 110

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
115 120 125

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
130 135 140

Asp Asn Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
165 170 175

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
180 185 190

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
195 200 205

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
210 215 220

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
225 230 235 240

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
245 250 255

Sequence Listing

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
260 265 270

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
275 280 285

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
290 295 300

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
305 310 315 320

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp
355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
370 375 380

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
405 410 415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

Sequence Listing

465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

 485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

500

<210> 23

<211> 1335

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1332)

<223> TNFR1/Fc

<400> 23

atg ggc ctc tcc acc gtg cct gac ctg ctg ctg ccg ctg gtg ctc ctg 48

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

gag ctg ttg gtg gga ata tac ccc tca ggg gtt att gga ctg gtc cct 96

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro

20 25 30

cac cta ggg gac agg gag aag aga gat agt gtg tgt ccc caa gga aaa 144

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys

35 40 45

tat atc cac cct caa aat aat tcg att tgc tgt acc aag tgc cac aaa 192

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys

50 55 60

gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac 240

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp

65 70 75 80

Sequence Listing

tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc	288
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu	
85 90 95	
aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg	336
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val	
100 105 110	
gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg	384
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg	
115 120 125	
aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc	432
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe	
130 135 140	
aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc gtg cac ctc tcc tgc cag gag	480
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu	
145 150 155 160	
aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa	528
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu	
165 170 175	
aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt aag aaa agc ctg gag tgc acg	576
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr	
180 185 190	
aag ttg tgc cta ccc cag att gag aat gtt aag ggc act gag gac tca	624
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser	
195 200 205	
ggc acc aca gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca	672
Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
210 215 220	
ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc	720
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	
225 230 235 240	

Sequence Listing

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	768
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
245 250 255	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	816
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
260 265 270	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	864
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
275 280 285	
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc	912
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
290 295 300	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	960
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
305 310 315 320	
tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	1008
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
325 330 335	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	1056
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
340 345 350	
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	1104
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
355 360 365	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	1152
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
370 375 380	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	1200
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
385 390 395 400	

Sequence Listing

tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 1248
 Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac 1296
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1335
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 24
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Sequence Listing

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Sequence Listing

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 25
 <211> 2028
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2025)
 <223> TNFR2-TNFR1/Fc

<400> 25
 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Sequence Listing

<p>tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr 20 25 30</p>	96
<p>gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln 35 40 45</p>	144
<p>aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys 50 55 60</p>	192
<p>gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp 65 70 75 80</p>	240
<p>agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys 85 90 95</p>	288
<p>ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg 100 105 110</p>	336
<p>gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc ggc tgg tac tgc gcg ctg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu 115 120 125</p>	384
<p>agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg 130 135 140</p>	432
<p>ccg ggc ttc ggc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val 145 150 155 160</p>	480
<p>tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr 165 170 175</p>	528

Sequence Listing

gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg	576
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly	
180 185 190	
aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt	624
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser	
195 200 205	
atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc	672
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser	
210 215 220	
caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc	720
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser	
225 230 235 240	
ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc gga tcc	768
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser	
245 250 255	
ggg aac att tca ctg gtc cct cac cta ggg gac agg gag aag aga gat	816
Gly Asn Ile Ser Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp	
260 265 270	
agt gtg tgt ccc caa gga aaa tat atc cac cct caa aat aat tcg att	864
Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile	
275 280 285	
tgc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca	912
Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro	
290 295 300	
ggc ccg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc	960
Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe	
305 310 315 320	
acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc	1008
Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys	
325 330 335	

Sequence Listing

<p>cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg 340 345 350</p>	1056
<p>gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser 355 360 365</p>	1104
<p>gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr 370 375 380</p>	1152
<p>gtg cac ctc tcc tgc cag gag aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His 385 390 395 400</p>	1200
<p>gca ggt ttc ttt cta aga gaa aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys 405 410 415</p>	1248
<p>aag aaa agc ctg gag tgc acg aag ttg tgc cta ccc cag att gag aat Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn 420 425 430</p>	1296
<p>gtt aag ggc act gag gac tca ggc acc aca gca gag ccc aaa tct tgt Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys 435 440 445</p>	1344
<p>gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 450 455 460</p>	1392
<p>gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 465 470 475 480</p>	1440
<p>atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 485 490 495</p>	1488

Sequence Listing

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg	1536
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
500 505 510	
cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac	1584
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
515 520 525	
cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc	1632
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
530 535 540	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc	1680
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
545 550 555 560	
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg	1728
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
565 570 575	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc	1776
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
580 585 590	
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag	1824
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
595 600 605	
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc	1872
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
610 615 620	
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg	1920
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	
625 630 635 640	
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg	1968
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
645 650 655	

Sequence Listing

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct 2016
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 660 665 670

ccg ggt aaa tga 2028
 Pro Gly Lys
 675

<210> 26
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Sequence Listing

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser
 245 250 255

Gly Asn Ile Ser Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp
 260 265 270

Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile
 275 280 285

Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro
 290 295 300

Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe
 305 310 315 320

Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys
 325 330 335

Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg

Sequence Listing

340	345	350
Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser		
355	360	365
Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr		
370	375	380
Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His		
385	390	395 400
Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys		
405	410	415
Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn		
420	425	430
Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys		
435	440	445
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
450	455	460
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
465	470	475 480
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
485	490	495
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
500	505	510
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
515	520	525
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
530	535	540
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
545	550	555 560

Sequence Listing

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
565 570 575

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
580 585 590

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
595 600 605

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
610 615 620

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
625 630 635 640

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
645 650 655

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
660 665 670

Pro Gly Lys
675